



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Faculdade de Ciências Biológicas e Saúde

Marcia Maria Dourado Maranhão

**Estudo químico e biológico do extrato aquoso de *Hibiscus*  
*sabdariffa***

Rio de Janeiro

2020

Marcia Maria Dourado Maranhão

**Estudo químico e biológico do extrato aquoso de *Hibiscus sabdariffa***

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação, Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia Ambiental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Alaide de Sá Barreto

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/ REDE SIRIUS/ CZO

M311 Maranhão, Marcia Maria Dourado

Estudo químico e biológico do extrato aquoso de *Hibiscus sabdariffa* / Marcia Maria Dourado – 2020.  
63 f.

Orientadora: Alaide de Sá Barreto

Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Biológicas e Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental.

1. *Hibiscus sabdariffa* – Teses. 2. Extrato Aquoso – Teses. 3. Dose Letal – Teses. 4. Cromatografia – Teses. I. Barreto, Alaide de Sá. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Biológicas e Saúde. III. Título.

CDU 502

Bibliotecária: Joice Soltosky Cunha – CRB 7 5946

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Marcia Maria Dourado Maranhão

**Estudo químico e biológico do extrato aquoso de *Hibiscus sabdariffa***

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação, Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia Ambiental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 25 de junho de 2020.

Banca examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Alaide de Sá Barreto (Orientadora)

Faculdade de Ciências Biológicas e Saúde – UERJ

---

Prof. Dr. Paulo Roberto Soares Stephens

Fundação Oswaldo Cruz

---

Prof. Me. Claudia Cristina Hastenreiter da Costa  
Nascimento

Faculdade de Ciências Biológicas e Saúde – UERJ

---

Prof. Dr. Gláucio Diré Feliciano

Faculdade de Ciências Biológicas e Saúde – UERJ

Rio de Janeiro

2020

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha família pela paciência nos dias difíceis, à professora orientadora Dr. <sup>a</sup> Alaíde de Sá Barreto por todo o ensinamento que obtive, não só sobre este trabalho, mas também de vida.

Agradeço aos meus amigos, do Curso de Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia Ambiental aos meus familiares por não me deixarem desistir da pós-graduação.

Aos professores da UEZO que muito me ensinaram ao longo dos períodos.

Enfim, a todos que, de alguma maneira, colaboraram para a realização desse trabalho.



“Tudo posso naquele que me fortalece.”

*Filipenses 4:13*

## RESUMO

MARANHÃO, Marcia Maria Dourado. **Estudo químico e biológico do extrato aquoso de *Hibiscus sabdariffa***. 2020. 63 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Faculdade de Ciências Biológicas e Saúde, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

O *Hibiscus sabdariffa*, popularmente conhecido como hibisco, vinagreira ou quiabo-da-guiné é uma planta que tem despertado um grande interesse nas pesquisas da área acadêmica, muito provavelmente devido à sua propriedade antioxidante. Embora se tenham vários estudos relatando o uso do *Hibiscus sabdariffa*, até o momento não foram descritos na literatura sua ação antioxidante em cepas de *Escherichia coli* selvagem (AB 1157), na presença e na ausência do agente redutor cloreto estânico, bem como em bioensaios de toxicidade sobre *Artemia salina* Leach. O perfil fitoquímico preliminar do extrato aquoso dos cálices de *Hibiscus sabdariffa* apresentou flavonoides, antocianinas, cumarinas e saponinas. O potencial antioxidante foi de 324,95 mM Trolox/g, medido por ABTS. A dose letal mediana (DL<sub>50</sub>) do extrato foi de 1000 ppm, se mostrando tóxica nesta concentração. O extrato apresentou ação antimicrobiana na dose de 24µL e sinergismo quando associado à discos de cloranfenicol em cepas de *Escherichia coli* selvagem (AB 1157). Foram identificadas através de CLUE-ESI-TOF-EM. as antocianinas: cianidina 3-sambubiosídeo e a delphinidina 3-sambubiosídeo como constituinte majoritário do extrato.

Palavras-chave: *Hibiscus sabdariffa*. Extrato Aquoso. Dose Letal. Cromatografia.

## ABSTRACT

MARANHÃO, Marcia Maria Dourado. **Estudo químico e biológico do extrato aquoso de *Hibiscus sabdariffa***. 2020. 63 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Faculdade de Ciências Biológicas e Saúde, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

*Hibiscus sabdariffa*, popularly known as hibiscus, vinegar or guinea okra, is a plant that has gained great interest in academic research. Most likely due to its antioxidant property. Although there are several studies reporting the use of *Hibiscus sabdariffa*, to date, its antioxidant action in strains of wild *Escherichia coli* (AB 1157) has not been described in the presence and absence of the reducing agent stannous chloride, as well as and bioassays of toxicity on *Artemia salina* Leach. The preliminary phytochemical profile of the aqueous extract of the *Hibiscus sabdariffa* chalice showed flavonoids, anthocyanins, coumarins and saponins. The antioxidant potential was 324.95 mM Trolox / g measured by ABTS. The median lethal dose (LD<sub>50</sub>) of the extract was 1000 ppm, proving to be toxic at this concentration. The extract showed antimicrobial action at a dose of 24 µL and synergism when associated with chloramphenicol discs in strains of wild *Escherichia coli* (AB 1157). Anthocyanins were identified through CLUE-ESI-TOF-EM: cyanidin 3-sambubioside and delphinidine 3-sambubioside as the major constituent of the extract.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa*. Aqueous Extract. Lethal Dose. Spectrophotometry. Chromatography.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	15
Figura 2-	Morfologia <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	17
Figura 3-	Principais antocianinas encontradas em frutas e flores.....	19
Figura 4-	Nauplio de <i>Artemia salina</i> recém eclodido.....	22
Figura 5-	Técnica de disco-difusão em meio ágar, com discos dispostos de forma a não haver a sobreposição dos halos.....	33
Quadro1-	Performance do ensaio inibição do crescimento por disco-difusão.....	35
Tabela 1-	Resultado dos testes fitoquímicos.....	38
Figura 6-	Curva DL <sub>50</sub> para o extrato aquoso de <i>Hibiscus sabdariffa</i> .....	39
Figura 7-	Curva analítica do trolox para determinar a atividade antioxidante pelo método ABTS.....	40
Figura 8-	Correlação dos diversos tratamentos* utilizando diferentes volumes, associados ou não ao extrato aquoso de <i>Hibiscus sabdariffa</i> e os halos de inibição de crescimento bacteriano para a cepa <i>E. coli</i> AB AB1157.....	41
Figura 9-	Correlação dos diversos tratamentos* utilizando diferentes volumes, associados ou não ao extrato aquoso in natura de <i>Hibiscus sabdariffa</i> e os halos de inibição de crescimento bacteriano para cepa AB 1157.....	42
Figura 10-	Perfil cromatográfico (CLAE/UV) de extrato aquoso de folhas de <i>Hibiscus sabdariffa</i> . (B)- Espectro na região do ultravioleta do composto de tempo de retenção de 11.827 min (1) e do composto com tempo de retenção 13,196 min, (2) .....	43
Figura 11-	(A)- Perfil cromatográfico (CLUE – UV - EM) de extrato aquoso de folhas de <i>Hibiscus sabdariffa</i> ; (B)- Espectrometria de massas modo positivo das substâncias 1 e 2 .....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB1157	Adelberg, cepa de <i>Escherichia coli</i> selvagem e proficiente em todos os mecanismos de reparo ao stress oxidativo
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BW9091	Bernard Weiss, cepa de <i>Escherichia coli</i> com 21 mutações que conferem sensibilidade ao stress oxidativo
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
G	Grama
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
LAQB	Laboratório de Análise Química e Biológica
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
MS	Ministério da Saúde
NaCl	Cloreto de Sódio
Nm	Nanômetros
OMS	Organização Mundial da Saúde
ppm	Parte por milhão
SnCl <sub>2</sub>	Cloreto Estanoso
ESI-TOF-EM	Espectrometria de Massas por Ionização por Eletrospray com Analisador do tipo "Time of Fly"

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	27
1.1	<b>Geral</b> .....	27
1.2	<b>Específicos</b> .....	27
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	28
2.1	<b>Obtenção do extrato aquoso</b> .....	28
2.2	<b>Avaliação fitoquímica preliminar</b> .....	28
2.2.1	<u>Ensaio para a identificação de terpenóides e esteroides</u> .....	29
2.2.2	<u>Ensaio para a identificação de flavonoides</u> .....	29
2.2.3	<u>Ensaio para a identificação de taninos</u> .....	29
2.2.4	<u>Ensaio para a identificação de cumarina</u> .....	29
2.2.5	<u>Ensaio para a identificação de saponina</u> .....	30
2.2.6	<u>Ensaio para a identificação de glicosídeos</u> .....	30
2.3	<b>Ensaio de Toxicidade usando <i>Artemia salina</i></b> .....	30
2.4	<b>Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS</b> .....	31
2.5	<b>Ensaio de sensibilidade com antimicrobianos (Disco-Difusão)</b> .....	32
2.6	<b>Cromatografia Líquida de Ultra eficiência (CLUE)</b> .....	36
3	<b>RESULTADOS</b> .....	38
3.1	<b>Testes fitoquímicos preliminares</b> .....	38
3.2	<b>Ensaio de toxicidade</b> .....	39
3.3	<b>Ensaio com redução do radical ABTS em TEAC</b> .....	39
3.4	<b>Ensaio de sensibilidade aos antimicrobianos</b> .....	40
3.5	<b>Cromatografia Líquida de Ultra eficiência (CLUE)</b> .....	42
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	45

<b>CONCLUSÕES</b> .....	51
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	52
<b>ANEXO A</b> - Formato final do 1º artigo científico submetido.....	62
<b>ANEXO B</b> - Comprovação do 1º capítulo de livro submetido.....	63

## INTRODUÇÃO

As plantas medicinais sempre gozaram de prestígios, desde tempos remotos. Povos antigos inseriram em suas culturas o uso de plantas medicinais na tentativa de diminuir suas mazelas (SILVA et al., 2018; BRASIL, 2016).

No Brasil, há relatos do uso de plantas pelos indígenas. Estas populações possuem complexas e estreitas relações com os recursos naturais, sobretudo com os vegetais, favorecidas pelos aspectos históricos, culturais e ambientais que as circundam (HAVERROTH, 2013).

A descoberta dos componentes presentes em plantas medicinais, bem como seus mecanismos de ação biológica, vem sendo um dos maiores desafios para a química, bioquímica e a farmacologia (HAMIDI, JOVANOVA, PANOVSKA, 2014). Contudo, apenas cerca de 20% das espécies vegetais existentes foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal. Entre as propriedades farmacológicas estudadas em produtos naturais estão a ação antioxidante e antimicrobiana. A avaliação desta atividade tem sido uma questão importante, considerando sua importância sobre a saúde humana, uma vez que os agentes antioxidantes naturais apresentam baixo risco à saúde, quando comparados aos sintéticos que apresentam efeito tóxico (LEITE et al., 2013).

A complexidade das composições dos produtos naturais pode promover a toxidez nos sistemas fisiológicos ou interagir na farmacocinética e ou farmacodinâmica de outros xenobióticos, administrados concomitantemente com o produto natural. ANVISA (2013) preconiza o conhecimento toxicológico de cada ingrediente utilizado na fabricação de medicamentos, alimentos ou na cosmetologia e suas características. A adoção dessas medidas evita problemas durante o desenvolvimento do produto final e até mesmo após a sua colocação no mercado (ANVISA, 2013).

Os ensaios pré-clínicos são realizados *in vitro* e *in vivo*. Os estudos *in vitro* são considerados modelos experimentais de caráter preliminar. Estes precisam de outros estudos complementares para maior precisão dos resultados obtidos. Os principais ensaios *in vitro* são os testes de citotoxicidade, genotoxicidade e fototoxicidade. A maioria dos experimentos que visam testar a toxicidade, utilizam

camundongos em desenvolvimento, apresentando desvantagens para o método como o gasto de quantidade de amostra e o elevado custo (RIOS, 1995). A toxicologia estuda o efeito de determinadas substâncias em organismos vivos (NASCIMENTO et al., 2008).

O primeiro tipo de teste toxicológico a que são submetidos os compostos é o agudo-letal, que consiste de uma análise após curta exposição (24h – 48h) do composto com o organismo bioindicador. Em toxicologia, bioindicadores são seres vivos de natureza diversa, utilizados para avaliação da qualidade ambiental, já o termo dose letal mediana (DL<sub>50</sub> ou LD<sub>50</sub>, do inglês Lethal Dose) refere-se a dose necessária de uma dada substância ou tipo de radiação para matar 50% de uma população em teste [normalmente medida em miligramas de substância por quilograma de massa corporal dos indivíduos testados (mg/kg = ppm). A letalidade da *Artemia salina* é utilizada para identificar respostas biológicas em diversas substâncias, nas quais as variáveis como a morte ou vida são as únicas envolvidas. A utilização do crustáceo *Artemia* é uma espécie de fácil manipulação em laboratório e baixo custo econômico (CARVALHO et al., 2009). Estudos comprovam a ação tóxica de várias substâncias naturais ao crustáceo *Artemia*.

A espécie *Hibiscus sabdariffa* (*H. sabdariffa*) tem se mostrado de grande interesse acadêmico e comercial devido ao seu poder antioxidante. É considerado um alimento funcional nos países da África e Ásia. Na Índia e no México as infusões preparadas com o cálice do *Hibiscus sabdariffa* são tradicionalmente usadas por sua atividade diurética, anticolesterolêmica, febrífuga, anti-hipertensiva e aumento do peristaltismo intestinal (DA-COSTA-ROCHA et al., 2014; PEREIRA, CARDOSO, 2012). Os principais constituintes do cálice do hibisco são os ácidos orgânicos, polissacarídeos e os flavonóides (CISSÉ, 2012). Embora se tenham vários estudos relatando o uso do *Hibiscus sabdariffa*, ainda não foram descritos na literatura sua ação antioxidante em cepas de *Escherichia coli* selvagem (AB 1157), na presença e na ausência do agente redutor cloreto estano; determinação da concentração dos compostos fenólicos, bem como, bioensaios de toxicidade sobre *Artemia salina* Leach.

A necessidade nutricional requerida pelo organismo humano nos estados de saúde e doença tem sido objeto de intensa investigação nos últimos anos. Atualmente, existe a uma preocupação generalizada quanto à caracterização química e à pesquisa de substâncias fitoquímicas dos alimentos com potencial

nutricional, em especial os de baixo valor calórico, uma vez que a obesidade e as doenças crônico-degenerativas provocadas pela exposição constantes a poluição e ao acúmulo de radicais livres em nosso organismo passam a ser alvo de investigação em saúde pública (OHSE et al., 2012; DUTRA-DE-OLIVEIRA; MARCHINI, 2008).

Uma dieta constituída de nutrientes essenciais e de substâncias fitoquímicas benéficas, como parte de um estilo de vida saudável, tem um papel importante na prevenção, aumento da imunidade e/ ou cura de patologias crônicas não transmissíveis (BALUNAS; KINGHORN, 2005; OMS, 2000). Há diversas evidências de que o consumo de antioxidantes pode ajudar a manter a saúde e prevenir doenças (BRAVO, 1998; SHAHIDI, NACZK, 1995). Portanto, o estresse oxidativo ocorre quando a produção de moléculas prejudiciais, chamadas de radicais livres, está além da capacidade protetora das defesas antioxidantes naturais (SOUSA et al., 2007; MAISUTHISAKUL; SUTTAJIT; PONGSAWATMANIT, 2007; REID et al., 2005; BRAVO, 1998; SHAHIDI, NACZK, 1995). As flores comestíveis, por exemplo, apresentam diversas substâncias com propriedades antioxidantes, as quais podem ser mais eficientes e mais baratas que suplementos sintéticos usados na proteção dos danos pelo acúmulo de radicais livres em nosso organismo.

As substâncias antioxidantes apresentam diferentes propriedades protetivas e são capazes de agir em diversas etapas dos processos oxidativos diminuindo os danos aos componentes celulares inclusive ao próprio ácido desoxirribonucleico (DNA), o envelhecimento e o aparecimento de diversas doenças como arteriosclerose, artrite, câncer e catarata (TAKEMOTO, TEIXEIRA FILHO, GODOY 2009; LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007; MAISUTHISAKUL; SUTTAJIT; PONGSAWATMANIT, 2007; SOUSA et al., 2007; REID et al., 2005; RAMALHO, 2005; 2005; HERMES-LIMA, 2004; HALLIWELL; GUTTERDGE, 1999). Além disso, o estresse oxidativo produz danos em lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucléicos contribuindo para problemas patológicos no organismo (HASSIMOTTO, GENOVESE, LAJOLO, 2005).

A indústria, alimentícios, cosméticos e farmacêuticos também têm um grande interesse pelo estudo da oxidação lipídica, em virtude da deterioração que o dano oxidativo pode causar em seus produtos (odores e sabores desagradáveis, decréscimo do tempo de validade dos produtos, diminuição da segurança e da qualidade nutricional, causados pela formação de compostos potencialmente

tóxicos) e conseqüentemente rejeição dos consumidores (TSAI, TSAI, SU, 2005). O desafio atual para a pesquisa industrial nos últimos anos é a busca por antioxidantes naturais para produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos, na manutenção da saúde e prevenção de doenças (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007). Esses antioxidantes são obtidos sobretudo de produtos de origem vegetal: compostos flavonoídicos, antocioninas, fenólicos, ácido 2 ascórbico e carotenoides (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007). Extratos de flores, chá, uva e citros estão entre as principais fontes de antioxidantes naturais estudadas. Além do potencial antioxidante depender da estrutura química dos compostos fenólicos, sabe-se que um efeito antioxidante isolado pode reagir sinergicamente com outras substâncias que contribuem para potencializar essa função (GIADA; MANCINI FILHO, 2006).

O gênero *Hibiscus* pertence à família Malvaceae e compreendem mais de 300 espécies de ervas anuais ou perenes, arbustos ou árvores. A espécie *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus (Figura 1), é uma herbácea anual, podendo atingir 2,4 m de altura, de fácil cultivo, sendo encontrada em regiões tropicais e subtropicais, especialmente na Índia, Arábia Saudita, China, Malásia, Indonésia, Filipinas, Vietnã, Sudão, Egito, Nigéria e México (OKEREKECN, 2015). É utilizada nas indústrias farmacêutica e alimentícia, e sua fibra pode ser utilizada em confecções de vestuários, redes de pesca e cordas (MOHAMAD et al., 2012; LORENZI et al., 2002;).

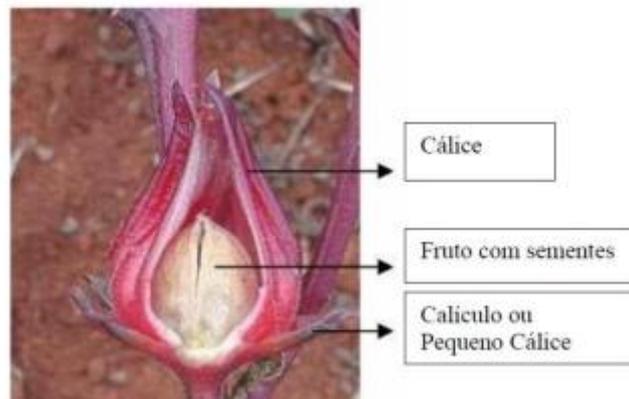
Figura 1 - *Hibiscus sabdariffa* L.



Fonte: Adaptado de publicinformations: benefits of rosella *Hibiscus sabdariffa*, 2011.

A espécie *Hibiscus sabdariffa* também conhecida popularmente por vinagreira, quiabo-azedo, caruru-azedo e azedinha, rosela ou groselha, pertence à mesma família do quiabo e do algodão; se apresenta como um subarbusto ereto, rico em ramificações, de caule roxo, podendo medir de 80 a 260 cm de altura (MORTON, 1987). Ainda há controvérsias sobre a origem da espécie; alguns autores citam que a planta tem origem na Malásia e na Índia (MURDOCK, 1959 citado por ORWA e colaboradores (2009) e outros que é nativa de algumas regiões da África. Porém, o que todas as fontes concordam é que foi trazida para o Brasil pelos escravos (LORENZI et al., 2002). As folhas apresentam de 3 a 5 lobos, 8 a 15 cm arranjados alternadamente pela haste (OKEREKECN, 2015). No Sudão as folhas são cozidas junto com cebolas e nozes, enquanto na Malásia elas são consumidas de forma crua na salada. Na África do Sul as sementes são torradas ou moídas e usadas em diversos pratos ou como substitutas das sementes de café (ISMAIL et al., 2008). As flores possuem de 8 a 10 cm de diâmetro, com uma coloração que varia do branco até um amarelo claro com uma mancha vermelha na base. Apresenta um cálice robusto que varia de 1 a 2 cm quando jovem e quando o fruto amadurece aumenta de 3 a 3,5 cm. O amadurecimento do cálice ocorre em aproximadamente 6 meses. A corola apresenta 5 sépalas em forma de cone com coloração avermelhada, formando o cálice. Na sua base se apresenta o cálculo (MACIEL et al., 2012). O cálice (Figura 2), anel externo envolto do fruto, é comumente utilizado em muitos lugares do mundo na forma de bebidas e alimentos como chás, compotas e geleias (LEPENGUE et al., 2009), em formulações cosméticas de sabonetes (ISMAIL et al., 2008) sendo também empregado como auxiliar em inibidores da corrosão de metais (OGUZIE, 2008). O cálice apresenta propriedades medicinais. Aproximadamente 100 gramas deste, *in natura*, apresenta: 49 calorias, 84,5% de água, 1,99 g proteína, 0,1 g. de lipídio, 12,3 g de carboidrato totais, 1,72 mg de cálcio, 57 mg de fósforo, 2,9 mg de ferro, 14 mg de ácido ascórbico (OKEREKECN, CHUKWUMA, 2015; ADESOKAN et al., 2013). O extrato aquoso e metanólico apresentam atividade antimicrobiana em cepas isoladas de *Escherichia coli* de amostras clínicas, alimentícias e veterinárias (ALMEIDA et al., 2018).

Figura 2- Morfologia *Hibiscus sabdariffa* L



Fonte: ROSA, 2013

No Egito é feito um chá fresco puro, enquanto na Síria e na Nigéria o cálice é fervido junto com açúcar para produzir uma bebida chamada Karkade (MOHAMED, 2012). No México, a mesma bebida é conhecida como Água da Jamaica (GALICIA-FLORES, 2008). Já no oeste da Índia, o cálice também é usado no preparo do rum, como colorante e flavorizante (ISMAIL et al., 2008). Na Índia, África e no México, as infusões feitas com as folhas ou o cálice são atribuídas propriedades diuréticas, antitérmicas, anti-hipertensiva e estimuladora do peristaltismo intestinal (DA-COSTA-ROCHA et al., 2014). No Egito, a infusão do cálice é usada em patologias do sistema circulatório e nervoso. Na Nigéria, a decocção das sementes é tradicionalmente usada na indução da produção de leite pelas glândulas mamárias de mães com baixa produção (MOHAMMAD et al., 2009)

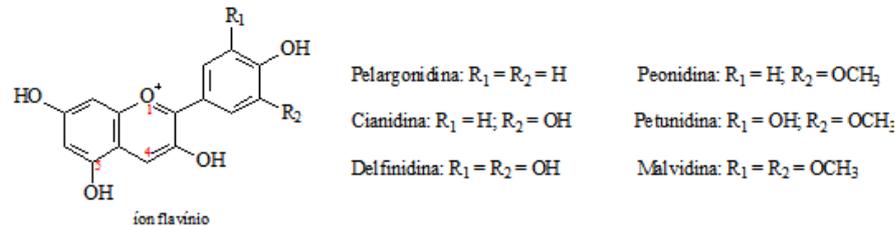
O hibisco consiste em uma grande fonte de fibra utilizada no preparo de tecidos e cordas de cânhamo na região do Oriente Médio. Apesar de ter um crescimento médio menos acentuado do que outras plantas, 180 dias para uma produção satisfatória de fibra, ela apresenta características que lhe conferem maior resistência a algumas pragas muito comuns de lavoura (MOHAMAD et al., 2009).

Da Silva e colaboradores (2018) fizeram o levantamento bibliográfico nas principais plataformas de artigos científicos (Scielo, Lilacs, Pubmed e Google acadêmico), utilizando duas associações de descritores: "Obesidade" e "hibisco" com o extrato infuso aquoso dos cálices Hibisco entre os anos 2014 e 2018. O estudo revelou que os extratos de *H. sabdariffa* promovem a redução de peso em

experimentos com animais. Verificou-se também que os índices de massa corporal, apetite e saciedade de indivíduos obesos com diabetes tipo I sofreram a redução estatisticamente significativa do IMC, porém não foram encontradas diferenças significativas no apetite ou saciedade. Este resultado foi associado a um possível efeito termogênico que poderia explicar a redução de peso.

As principais classes de substâncias isoladas em *Hibiscus sabdariffa*, são: ácidos orgânicos (ácido cítrico, ácido hidroxicítrico, ácido hibisco, málico e ácido tartárico; como maiores componentes), antocianinas (delfinidinas e cianidinas), polissacarídeos (mucilagem, arabinose, galactose, glicose, ramnose e em menores quantidades de ácido galacturônico, ácido glucurônico, manose e xilose) (ANOKWURU et al., 2011), flavonoides (hibiscetina, sabdaretina, gossipetina, gossitrina e outro glicosídeos de gossipetina, quercetina, luteolina, ácido clorogênico, ácido protocatecuico), ácido perlagonídico, eugenol (composto volátil derivado fenólico), esteróis  $\beta$ -sitosterol e ergosterol (DA-COSTA-ROCHA et al., 2014). Os flavonoides hibiscetina e sabdaretina, gossipetina e quercetina e o composto fenólico ácido ascórbico isolado em *H. sabdariffa* apresentaram teores mais elevados do que os encontrados na laranja e na manga (DA-COSTA-ROCHA et al., 2014). As antocianinas são solúveis em água e ocorrem nos tecidos de plantas, dissolvidas no fluído da célula vegetal com pH levemente ácido (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008). As antocianinas mais comumente encontradas em frutas e flores são derivadas principalmente de seis antocianidinas: pelargonidina, cianidina, delfinidina, peonidina, petunidina e malvidina. Dentre as principais antocianinas isoladas em *H. sabdariffa*, podemos destacar a: delfinidina 3-xilosilglucosídeo, a cianidina 3-xilosilglucosídeo, a cianidina 3-glicosídeo e a delfinidina 3-glicosídeo (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008). Vale ressaltar que o ácido protocateico e taninos também foram identificados em *H. sabdariffa*. (VIZZOTO, 2010). A literatura cita que muitos dos atributos benéficos conferidos ao hibisco se devem à presença desses diferentes tipos de compostos fenólicos, presentes em sua composição (DA-COSTA-ROCHA, 2014; VALENTI et al., 2013; MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008;). Vale ressaltar que atualmente há um grande interesse no estudo de substâncias fenólicas devido, principalmente, a sua capacidade antioxidante sobre os radicais livres e outros agentes oxidantes no organismo (MACHADO, 2008; OLALEYE, 2007; SALEM, OLIVARES-PÉREZ, SALEM, 2014).

Figura 3 - Principais antocianinas encontradas em frutas e flores



Fonte: Adaptado de MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008.

O crescente mercado dos produtos naturais aliado ao interesse dos consumidores na prevenção de doenças, tem pressionado a indústria alimentícia, farmacêutica e química na busca por produtos mais saudáveis, direcionando pesquisas nesse sentido. Para esta evolução a indústria, o processo e a consequente necessidade de preservação dos produtos, estão intimamente relacionados com o incremento da busca de compostos com propriedades antioxidantes (TSAI, TSAI, SU, 2005). Vale ressaltar que antioxidante é qualquer substância capaz de retardar ou impedir danos devidos à oxidação. As substâncias antioxidantes apresentam diferentes propriedades protetivas e são capazes de agir em diversas etapas dos processos oxidativos (MAISUTHISAKUL; SUTTAJIT; PONGSAWATMANIT, 2007). A literatura cita que substâncias antioxidantes ajudam na prevenção e na alteração oxidativa dos alimentos, tintas e no desenvolvimento de doenças crônicas como o câncer, doenças cardíacas, derrame, mal de Alzheimer, artrite reumatóide, catarata e envelhecimento (GUINDANI, 2014; MAISUTHISAKUL; SUTTAJIT; PONGSAWATMANIT, 2007). Além disso, há diversas evidências de que o consumo de antioxidantes pode ajudar à manter a saúde e prevenir doenças (MAISUTHISAKUL; SUTTAJIT; PONGSAWATMANIT, 2007). A atividade antioxidante dos polifenóis depende muito de suas propriedades estruturais, das ligações oxigênio-hidrogênio, energia de dissociação, a ressonância iniciada através do radical fenol e o impedimento estérico derivado da substituição do anel aromático (ANOKWURU et al., 2011). Compostos fenólicos são encontrados em plantas comestíveis e não comestíveis, e sua propriedade antioxidante se dá principalmente pelo seu potencial redox, que a faz atuar como um agente redutor ou um quelante

de oxigênio singlete (SILVA et al., 2018b). Esses compostos ganham evidente importância devido ao fato de terem grande funcionalidade na regulação do organismo humano (MARQUES et al., 2004). Atualmente, a extração e purificação de compostos bioativos, como as antocianinas provindas de fonte natural, tem se tornado alvo de grandes estudos para o uso na indústria de alimentos: nutracêuticos, suplementos, ingredientes funcionais em alimentos e na indústria farmacêutica e cosmética (CISSÉ et al., 2012). Antioxidantes podem ser definidos como substâncias sintéticas ou naturais, que em baixa concentração, retarda ou previne a oxidação de um substrato (ROCHA, 2007; SILVA, 2018a). Um bom antioxidante deve ser capaz de doar elétrons ou hidrogênio ao radical, quelar metais de transição; ter acesso ao local de ação, dependendo bastante de características intrínsecas, como hidrofília ou lipofília, e capacidade de deslocamento do radical formado em sua estrutura (SUCUPIRA, 2015; BORGES, et al., 2011; SOUSA et al., 2010)

Não há um método universal para determinar quantitativamente a atividade antioxidante (ALVES et al., 2010). Porém, as metodologias mais utilizadas na avaliação do potencial antioxidante e redutor, são os métodos DPPH, ORAC e ABTS. A capacidade de absorção do radical oxigênio (Oxygen radical absorbance capacity) ou ORAC é um método que se baseia na propriedade fluorescente das proteínas B/R-ficoeritrina (MELO et al., 2011). Neste ensaio, o radical peroxil reage com um indicador fluorescente, para gerar um produto não fluorescente (ALVES et al., 2010. MELO et al., 2011, BORGES et al., 2011. SOUSA et al., 2011). O método do ABTS [sal de amônio do ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzenotiazolina 6-sulfônico)] está baseado na habilidade dos antioxidantes em capturar o cátion ABTS. Ocorrendo a captura, provoca um decréscimo na absorbância, que é lida a partir da mistura do radical com o antioxidante em diferentes tempos, sendo representadas na forma de gráfico (FLOEGEL et al., 2011; SUCUPIRA, 2015).

A toxicologia é definida tradicionalmente como a ciência dos “venenos” (UMBUZEIRO, KUMMROW, REI, 2010). Atualmente, a toxicologia possui um caráter preventivo e, entre os seus principais objetivos estão o entendimento dos mecanismos de ação dos agentes tóxicos, bem como o cálculo da probabilidade de ocorrência de seus efeitos adversos de acordo com cenários de exposição. O cálculo dessa probabilidade é usualmente realizado por um processo denominado

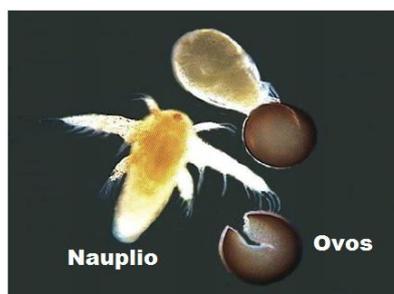
avaliação de risco, que é a uma das principais ferramentas utilizadas pela toxicologia (EATON, GILBERT, 2013).

Devido à complexibilidade das composições dos produtos naturais, não é negligenciável a possibilidade de ocorrência de substâncias com elevada toxicidade, capazes de interferir com sistemas fisiológicos ou interagir na farmacocinética e ou farmacodinâmica de outros xenobióticos administrados concomitantemente (ANVISA, 2013). A ANVISA (2013) preconiza o conhecimento toxicológico de cada ingrediente utilizado na fabricação de medicamentos, alimentos ou na cosmetologia e suas características. A adoção dessas medidas evita problemas durante o desenvolvimento do produto final e até mesmo após a sua colocação no mercado (ANVISA, 2003). Os testes pré-clínicos são realizados *in vitro* e *in vivo*. Os estudos *in vitro* são considerados modelos experimentais de caráter preliminar. Estes precisam de outros estudos complementares para maior precisão dos resultados obtidos. Os principais ensaios *in vitro* são os testes de citotoxicidade, genotoxicidade e fototoxicidade (ANVISA, 2013). A maioria dos experimentos de toxicidade utilizam modelos com gasto de quantidade de amostra e o elevado custo (RIOS, 1995; CARVALHO et al., 2009; RIOS, 1995; NASCIMENTO et al., 2008).

A *Artemia salina* é um micro crustáceo de água salgada podendo ser visto a olho nú ou com maior facilidade usando um microscópio (BUENO, 2015). Pertencente a subclasse *Branchiopoda*, que é caracterizado pela quantidade de apêndices achatados na região torácica. Tem como habitat lagos e lagoas salgadas e mares (ROGERS, 2013). São naturalmente filtradores, pois seu mecanismo de alimentação está relacionado a bombear a água para dentro de si e então selecionam a partículas de interesse, que são basicamente, microalgas, matéria orgânica e fungos (DE ARAUJO, 2010). O primeiro tipo de teste toxicológico a que são submetidas as substâncias e/ ou formulações é o agudo-letal. Este ensaio consiste de uma análise após curta exposição (24h – 48h) do material com o organismo bioindicador, geralmente ratos ou coelhos. A principal desvantagem ocorre na grande quantidade de amostras utilizadas e os custos elevados (RIOS, 1995; FREITAS DE OLIVEIRA, 2008). A dose letal mediana (DL<sub>50</sub> ou LD<sub>50</sub>, do inglês Lethal Dose) é a dose necessária de uma dada substância ou tipo de radiação para matar 50 % de uma população em teste [normalmente medida em miligramas de substância por quilograma de massa corporal dos indivíduos testados (mg/kg =ppm)]. Segundo Meyer e colaboradores (1982) são consideradas tóxicas substâncias que

apresentam DL<sub>50</sub> abaixo de 1000 ppm em *Artemia salina* (EATON, GILBERT, 2013; OLALEYE, 2007; MEYER et al., 1982). A letalidade da *Artemia salina* é utilizada para identificar respostas biológicas em diversas substâncias, nas quais as variáveis como a morte ou vida são as únicas envolvidas (CARVALHO et al. 2009). Estudos comprovam a ação tóxica de várias substâncias naturais ao crustáceo *Artemia salina* (RIOS, 1995; NASCIMENTO et al, 2008). Os cistos de *Artemia salina* são facilmente encontrados em lojas de piscicultura por servirem como alimento de peixes tropicais. Podem ser armazenados em ambiente seco e sob condições anaeróbias por bastante tempo sem perder a validade, porém uma vez hidratado o embrião dentro do ovo volta as suas atividades fisiológicas e após algumas horas os nauplios nascem (Figura 4). Neste momento são iniciados os testes de toxicidade aguda (CUNHA, 2011). O bioensaio com *Artemia salina* (BST – Brine Shrimp Test) é utilizado como bioindicador em uma avaliação toxicológica pré-clínica (LILIBETH, 2013; OLOWA, NUÑEZA, 2017). Este bioensaio apresenta como principais vantagens a rapidez, praticidade, simplicidade, baixo custo e o uso de pouca quantidade de amostra aplicável.

Figura 4- Nauplio de *Artemia salina* recém eclodido



Fonte: Adaptado de Cunha, 2011.

*Escherichia coli* é uma bactéria gram-negativa, oxidase-negativa, em forma de bastonete, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Tem crescimento ideal em meio aeróbio e anaeróbio, em temperatura 37°C, podendo apresentar motilidade ou não. *E. coli* é facilmente isolada de amostras fecais (MAJOWICZ et al., 2014). No agar MacConkey elas apresentam coloração rosácea ou vermelha. É bem descrita no meio científico, é uma comensal do trato gastrointestinal em animais de sangue quente. Entretanto, apresenta uma alta taxa de mutações com ganho e perda de genes, o que lhe confere uma alta adaptabilidade em termos de resistência e

patogenia (BRYCE et al., 2016; MAJOWICZ et al., 2014). A bactéria *Escherichia coli* é um exemplo de simbiote que pode apresentar três estratégias em único hospedeiro, causando desde graves infecções a benefícios defensivos e nutricionais. Assim sendo, ela é uma perfeita candidata ao estudo de transição entre o comensalismo e a patogenicidade e/ ou de forma mais aprofundada, quais variações básicas que rompem a frágil limiar estabilidade entre o mutualismo, comensalismo e oportunismo patogênico da bactéria *Escherichia coli*. (ROSANO, CECCARELLI, 2014; CROXEN et al., 2013). Dentre as espécies do gênero *Escherichia*, destacam-se as cepas selvagens AB 1157 que todos os genes para reparo no DNA se encontram funcionais. (CROXEN et al., 2013). O ensaio de difusão, desenvolvido por HEATLEY (1944), é um processo preciso, simples e barato, usado na rotina de laboratórios microbiológicos para testes de susceptibilidade. Os ensaios de difusão são métodos quantitativos, nos quais o efeito pode ser graduado. A substância ou extrato a ser ensaiado são difundidos em um meio de cultura sólido e inoculado com o microrganismo. A partir da difusão, ocorre o aparecimento de um halo, no qual não há crescimento do microrganismo, denominado halo de inibição. Diferentes tipos de reservatórios podem ser empregados, incluindo discos de papel, cilindros de porcelana ou de aço inoxidável e poços feitos no meio de cultura (VANDENBERGHE, VLIETINCK, 1991). Controles positivos e negativos são feitos em paralelo para assegurar que o ensaio saiu como o esperado. Como o halo formado corresponde a uma dada concentração, se faz necessário um método de aferição ou contagem, usualmente, um transferidor. Esse método permite classificar, de forma qualitativa, os espécimes previamente escolhidos em suscetíveis ou resistentes e em conjunto avaliar a toxicidade do composto de interesse promovido pelo substâncias que promovem o estress oxidativo celular (BALOURI, et al., 2016; KRONVALL, GISKE, KAHLMETER, 2011; DRISCOLL, 2012).

A literatura cita ensaios com cloreto de estanho (II) ou cloreto estanoso (DE MATTOS et al., 2000). O  $\text{SnCl}_2$  é amplamente utilizado na vida humana diária, por exemplo, para conservar refrigerantes, na fabricação de alimentos e preparações biocidas. O cloreto estanoso é capaz de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem danificar o DNA (DE MATTOS et al., 2000). Este sal é um poderoso agente redutor sendo também utilizado em amálgamas dentárias. Estudos anteriores demonstraram que o cloreto estanoso é capaz de inativar culturas de *Escherichia*

*coli* (MELO et al., 2001) e células K562 (DANTAS et al., 1996), bem como induzir rupturas de cadeia simples no DNA plasmídico através da geração de radicais livres *in vitro* (FERREIRA-MACHADO et al., 2004). Existem controvérsias sobre os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do SnCl<sub>2</sub> na literatura. Em experimentos de inativação bacteriana utilizando e *Escherichia coli* AB1157 (tipo selvagem) demonstraram que o SnCl<sub>2</sub> apresentou uma toxicidade elevada. A inativação celular induzida por SnCl<sub>2</sub> encontrado na estirpe mutante XthA, sugerem que a falta da enzima endonuclease IV pode ser responsável pela incapacidade na reparação de danos no DNA relacionado ao efeito do SnCl<sub>2</sub>. Vários autores demonstraram os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do SnCl<sub>2</sub>. Em relação ao SnCl<sub>2</sub>, foi descrito que este sal é capaz de produzir espécies reativas de oxigênio (ERO) a partir de uma reação semelhante a Fenton, induzindo letalidade em *Escherichia coli* (DANTAS et al., 1996), citotoxicidade e genotoxicidade em células eucarióticas, e genotoxicidade no plasmídeo DNA (DE MATTOS et al., 2000). As propriedades mutagênicas também foram relatadas para o SnCl<sub>2</sub>, sendo a 8-hidroxi guanina (8-oxodGuo) a lesão predominante, responsável pelas transversões G: C-T: A (CABRAL et al., 1998), bem como a mutagenicidade em leveduras e bactérias (PUNGARTNIK et al., 2005). O SnCl<sub>2</sub> também é capaz de induzir um efeito direto sobre o DNA. De Mattos e colaboradores (2005) sugeriram que os íons estanosos eram capazes de se ligar ao DNA, induzindo a formação de ERO muito próximo a esse alvo.

A *Escherichia coli*, em condições aeróbicas, usam oxigênio o molecular (O<sub>2</sub>) para a respiração ou oxidação de nutrientes para obtenção de energia. A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) é o resultado do metabolismo aeróbio durante uma irradiação ionizante tendo como resultado a produção de uma série de espécies radicais e peróxidos através da ionização de H<sub>2</sub>O intracelular (CABISCOL, TAMARIT, ROS, 2000). Nas bactérias o aumento na produção ERO durante o estresse oxidativo leva à oxidação dos tióis, entre outros efeitos. Alguns desses tióis fazem parte de proteínas celulares como o regulador transcricionais OxyR e SoxRS, que demonstram desempenhar um papel importantíssimo no estresse oxidativo bacteriano (CHASTEEN, et al., 2009). Em *E. coli* ambos os fatores de transcricionais SoxRS e OxyR, atuam de formas distintas. O SoxRS ativa a resposta a produção de superóxido e seus radicais, detoxificando por ação da superóxido dismutase (SOD). Já o o fator OxyRS regula a expressão de vários genes induzíveis de peróxido de

hidrogênio que codificam enzimas que participam da resposta bacteriana ao estresse oxidativo, podemos citar como exemplo a hidroperoxidase I, alquil-hidroperóxido redutase, glutathione redutase, glutaredoxina 1, tioredoxina-2, entre outras. Os níveis de ERO em *E. coli* são controlados pelas enzimas antioxidantes SOD, que atua convertendo  $O_2$  em  $H_2O_2$ , e catalases que é responsável pela conversão de  $H_2O_2$  em  $H_2O$  (CHOIA, YANG, WEISSHAAR, 2015). A *E. coli*, como a maioria das bactérias, contém superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) como forma de eliminação de  $O_2^-$  e  $H_2O_2$ , respectivamente (MCCORMICK, 1997), sendo amplamente distribuídas em organismos aeróbicos. Desde a descoberta dessas metaloenzimas, a SOD foi considerada como uma enzima chave na defesa contra o estresse oxidativo. Ela (SOD) pode catalisar  $O_2^-$  para  $O_2$  e  $H_2O_2$  rapidamente. Então  $H_2O_2$  é decomposto em  $H_2O$  e  $O_2$ . Para muitas bactérias em ambientes naturais, a resistência a  $H_2O_2$  e  $O_2^-$  é principalmente devido à presença de SOD e CAT (LIN et al., 2009). A catalase por sua vez, possui um grupamento heme e tem a capacidade de degradar rapidamente o  $H_2O_2$ . O grupo heme desta enzima interage com o  $H_2O_2$  formando o peróxido de ferro, comumente chamado de componente 1, que em baixas concentrações de  $H_2O_2$  é reduzido por doadores de hidrogênio e em condições elevadas é catalisado rapidamente, formando  $H_2O$  e  $O_2$ . Em células de *E. coli*, com crescimento aeróbio estão equipadas com duas superóxido dismutases (MnSOD e FeSOD), e catalases (HPI e HPII)  $H_2O_2$  desproporcional em  $H_2O$  e a hidroperóxido redutase de alquilo (Ahp), que é uma fornecedora de defesa adicional pela redução de vários hidroperóxidos orgânicos (IMLAY, 2013). As respostas genéticas bacterianas ao estresse oxidativo são controladas por dois principais reguladores transcricionais (OxyR e SoxRS) (IMLAY, 2013). Em condições normais de crescimento de *E. coli*, o SoxR é produzido em uma forma inativada (reduzida), mas quando exposto a superóxido, fármacos ou extratos de ciclo redox é ativado. O regulador OxyR é ativado principalmente pelo  $H_2O_2$ , aumentando a transcrição de um conjunto de genes que aumentam a resistência ao peróxido de hidrogênio (BAEZ, SHILOACH, 2013). É importante ressaltar que em estudos com *E. coli* com cepas mutantes, onde a atividade da SOD é suprimida, estes microrganismos se tornam mais suscetíveis aos danos causados pela produção de ERO, do que as cepas de tipo selvagem (como *E. coli* AB1157) (MCCORMICK, BUETTNER BRITIGAN, 1998).

A cromatografia tornou-se o primeiro método de separação de espécies quimicamente muito semelhantes (HOOLER; SKOOG; CROUCH, 2009). Surgiu em 1900 quando o botânico Mikhail S. Tswett decidiu tentar separar pigmentos de folhas de plantas, fazendo-as passar por uma coluna cheia de partículas de vidro. Para isso utilizou um extrato de folhas homogeneizadas com solvente puro. A análise foi feita com base através das diferentes faixas de cores vistas na coluna. Com isso, concluiu que a separação analítica se baseava na força de atração química que cada pigmento tinha com a fase estacionária, e conseqüentemente, escoavam de forma mais lenta (HOOLER; SKOOG; CROUCH, 2009). Com o avanço tecnológico, esta metodologia evoluiu para a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE (IGLESIAS, 2016) e posteriormente para a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência - CLUE (em Inglês UPLC). As principais modificações observadas em um sistema de CLUE são: capacidade de trabalhar à pressões muito altas (100 MPa), volumes internos muito menores (conexões, alça de amostragem, cela do detector, bombas), celas do detector sem dispersão e com alta taxa de aquisição, melhoramento no sistema de controle e de dados, colunas resistentes para trabalharem à altas pressões e com baixo volume morto, e injetores com precisão na faixa de volumes pequenos (MALDANER & JARDIM, 2009). O uso das partículas  $\leq 2 \mu\text{m}$  permitem a obtenção de picos cromatográficos com largura a meia altura menores que 1 s. Este avanço promoveu mudanças significativas nos detectores. As mais significativas ocorreram nos detectores ópticos convencionais (UV e DAD), que são projetados para equipamentos de CLAE, nos quais são injetadas maiores quantidades de amostra e o tempo de análise é mais longo, quando comparado com o de CLUE. O CLUE necessita de detectores com a diminuição do volume da cela e um longo caminho óptico, para manter a concentração e o sinal e uma baixa dispersão da amostra, a fim de se obter alta detectabilidade. As dimensões de volume da cela e o comprimento do caminho óptico desses detectores são de aproximadamente 500  $\mu\text{L}$  e 10 mm, respectivamente (MALDANER & JARDIM, 2009). As primeiras aplicações empregando um CLUE foram realizadas com um sistema acoplado a um EM com analisador de tempo de voo em análises de metabonomas e genomas. Atualmente, muitos trabalhos já foram realizados, empregando CLUE com os detectores ópticos (UV e DAD) e acoplado à espectrometria de massas, nas mais diversas áreas (MALDANER & JARDIM, 2009).

## 1 OBJETIVOS

### 1.1 Geral

Estudar alguns aspectos químicos e biológicos do extrato aquoso liofilizado de *Hibiscus sabdariffa*.

### 1.2 Específicos

- Realizar testes qualitativos para avaliações fitoquímicas do extrato aquoso liofilizado de *Hibiscus sabdariffa*;
- Avaliar a capacidade antioxidante *in vitro*, pelos métodos de captura de radicais ABTS<sup>+</sup> de um extrato aquoso liofilizado de *Hibiscus sabdariffa*;
- Verificar o potencial de toxicidade do extrato aquoso liofilizado de *Hibiscus sabdariffa*, através do bioensaio com *Artemia salina*;
- Analisar o potencial antimicrobiano e a sensibilidade perante antimicrobianos pelo ensaio de disco-difusão em cepas de *Escherichia coli* AB1157;
- Identificar os diferentes tipos de flavonoides presentes no extrato aquoso através de UPLC/ESI/TOF/EM

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Todas as atividades foram realizadas no Laboratório de Análise Química e Biológica (LAQB) da Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), exceto as atividades CLUE-DAD e CLUE-EM-DAD (Plataforma de Métodos Analíticos da Fundação Oswaldo Cruz) e Ensaio com redução do radical ABTS em TEAC (Embrapa de Barra de Guaratiba). As flores de Hibisco (*Hibiscus sabdariffa*) foram doadas pela empresa Interflora, sendo colhidas e desidratadas no Camboja.

### 2.1 Obtenção do extrato aquoso

Inicialmente foram pesados 30,0 g em BALANÇA semi-analítica (classe II Bel Mark 2500) dos cálices de hibisco. Em seguida, o cálice de hibisco (30,0 g) foi triturado, a seco, em um liquidificador (10 min). O extrato aquoso do cálice de hibisco foi obtido por infusão em um becker com 500 mL de água destilada quente (70 °C). Após 30 minutos, o chá (ou extrato aquoso) foi filtrado e guardado em potes de vidro com tampa de rosca, envelopados em papel alumínio (ALMEIDA et al., 2018). O extrato foi congelado (24 horas) e em seguida foi liofilizado (Liofilizador, LIOTOP 220) à uma temperatura de -80°C até massa constante (5g), e ao finalizar o processo, a amostra foi mantida congelada em freezer – 40°C (CONSUL).

### 2.2 Avaliação fitoquímica preliminar

Essas análises visaram a detecção de possíveis metabólitos secundários presentes no extrato aquoso, segundo metodologia descrita por Trease e Evans (1989).

### 2.2.1 Ensaio para a identificação de terpenóides e esteróides

Em um tubo de ensaio foi adicionado uma pequena porção do extrato liofilizado (10mg). Em seguida, adicionou-se a este 1250 µL de ácido anidro acético e 1250 µL de clorofórmio. Posteriormente, adicionou-se, lentamente, ácido sulfúrico concentrado (5 mL). O aparecimento ou intensificações da cor indicam a presença de terpenóides (se positivo a solução ficará na cor vermelho), e esteróides (se positivo a solução ficará na cor verde) (TREASE, EVANS, 1989).

### 2.2.2 Ensaio para a identificação de flavonoides

Em um tubo de ensaio foi adicionado uma pequena porção do extrato liofilizado (10mg). Em seguida, adicionou-se ao extrato 1,5 mL de metanol 50%. Aqueceu-se a amostra. Adicionou-se de magnésio metálico no tubo e 5-6 gotas de ácido clorídrico concentrado. O aparecimento ou intensificações da cor vermelha indica a presença de flavonoides (TREASE, EVANS, 1989).

### 2.2.3 Ensaio para a identificação de taninos

Em um tubo de ensaio foi adicionado 0,5 mL do extrato aquoso. Em seguida, adicionou-se ao extrato 1-2 gotas de uma solução de cloreto férrico. Observou-se a coloração formada. O aparecimento ou intensificações da cor azul ou preto-esverdeado indica a presença de taninos (TREASE, EVANS, 1989).

### 2.2.4 Ensaio para a identificação de cumarina

Em um tubo de ensaio foi adicionado 500 µL do extrato aquoso. Em seguida, adicionou-se ao extrato 750 µL de NaOH 10%. O aparecimento ou intensificações da cor amarelo indica a presença de cumarina (TREASE, EVANS, 1989).

### 2.2.5 Ensaio para a identificação de saponina

Em um tubo de ensaio foi adicionado 500 µL do extrato aquoso. Em seguida, adicionou-se ao extrato 1 mL e bicarbonato de sódio 1%. O aparecimento ou intensificações espuma indica a presença de saponina (TREASE, EVANS, 1989).

### 2.2.6 Ensaio para a identificação de glicosídeos

Em um tubo de ensaio foi adicionado algumas gotas de ácido anidro acético a uma pequena quantidade do extrato (10 mg). Em seguida, adicionou-se ao extrato 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. O aparecimento ou intensificações da cor verde azulada indica a presença de glicosídeos (TREASE, EVANS, 1989).

## 2.3 **Ensaio de Toxicidade usando *Artemia salina***

O ensaio de toxicidade dos extratos foi adaptado do método descrito por Meyer e colaboradores (1982), utilizando o microcrustáceo *Artemia salina*. Os ovos de *Artemia salina* foram adquiridos comercialmente, colocados em um aquário contendo 3 litros de solução sal marinho (38g/ L) e em pH 8. Foi utilizado uma bomba de ar para aquário e uma lâmpada fluorescente (período de 24:00h) para manter, respectivamente, o meio em constante movimento e sempre iluminado (Figura 9). Estes critérios (luz e aeração do meio) são necessários para promover a eclosão dos ovos e escolha dos nauplios (CARVALHO et al., 2009). O bioensaio foi realizado em triplicata a fim de verificar a relação dose-resposta. Dez larvas de *Artemia salina* Leach foram transferidas para cada um dos 12 tubos de ensaios contendo água artificial do mar e o extrato aquoso, em três diferentes concentrações e um controle com água do mar. O conjunto permaneceu em incubação sob luz artificial por 24h. Os grupos (em triplicata) foram montados da seguinte maneira:

- Grupo 1: Grupo controle preparado contendo apenas os metanúplios e água artificial do mar.
- Grupo 2: extrato de hibisco diluído a 10 ppm (parte por milhão) e volume final de 10 mL foi completado com água artificial do mar,

- Grupo 3: extrato 100 ppm e volume final de 10 mL foi completado com água artificial do mar,
- Grupo 4: extrato 1000 ppm e volume final de 10 mL foi completado com água artificial do mar,

Após 24h foi realizada a contagem do número de metanúplios vivos e o número de mortos para determinação da  $DL_{50}$  de acordo com Meyer e colaboradores (1982). Foi considerado morto aqueles que se sedimentaram ou que não tiveram movimento algum em 10 segundos. O resultado foi interpretado em valores de  $DL_{50}$  com a porcentagem e a concentração do composto testado. Para isso, utilizou-se o método SPEARMAN KARBER como análise para obtenção das DL (concentração letal média) e respectivos intervalos de confiança  $p < 0,5$ . Meyer e seus colaboradores estabeleceram uma relação entre o grau de toxicidade e a dose letal média,  $DL_{50}$ , apresentada por extratos de plantas sobre larvas de *Artemia salina*. Desde então, considera-se que quando são verificados valores acima de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Estas são consideradas atóxicas e quando menor que  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  são consideradas tóxicas (OMS, 2005).

#### 2.4 Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS

O método de redução do radical ABTS foi realizado conforme metodologia descrita por RE e colaboradores (1999). O método de redução do radical ABTS é um dos métodos mais utilizados para medir a atividade antioxidante através da captura do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), que pode ser gerado através de uma reação química (dióxido de manganês, persulfato de potássio, ABAP); enzimática (peroxidase, mioglobulina) ou eletroquímica química (dióxido de manganês, persulfato de potássio, ABAP). Com essa metodologia, pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSKI et al., 2005). Após o preparo do radical ABTS - [2,2'-azino-bis-(3- etilbenzotiazolina- 6-ácido sulfônico)] - (7 mM - 0,03836 g do reativo ABTS dissolvido em 10 mL de água deionizada), foi preparada uma solução de persulfato potássico (2,45 mM - 10 mL de ABTS (Sigma Aldrich, USA) e 10 mL de persulfato misturados, homogeneizados e

mantidos num frasco âmbar pelo mínimo de 16 h protegido da luz (KUSKOSKI et al., 2005). Para o ensaio da amostra, foi pipetada uma alíquota de 200 µL do radical formado e diluído em 10 mL de etanol 96° P.A. Medidas de absorbância em cubetas de 10 mm a 734 nm foram realizadas para certificação da densidade óptica em torno de  $0,700 \pm 0,02$  e a curva padrão foi preparada com 0,0101g do análogo hidrossolúvel da vitamina E, Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico; Sigma Aldrich, USA), dissolvido em 0,02L água deionizada ( $2018 \mu\text{M} = 0,002 \text{ mol/L}$ ), nas concentrações de 20,18 µM; 40,35 µM; 80,71 µM; 403,53 µM e 807,06 µM. Utilizou-se as concentrações de Trolox para construir uma curva de calibração. O extrato aquoso de hibisco foi homogeneizado em água deionizada, agitados por 30 minutos em agitador para tubo tipo vortex 3300 rotações por minuto (rpm), com 250 µL de solução ABTS<sup>•+</sup> durante 6 minutos no escuro a 600 rpm. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância a 734 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata, resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Diferenças entre as médias no nível de 5% ( $P < 0,05$ ) foram consideradas significantes. Admitiram-se resultados com coeficiente de variação (CV) abaixo de 10%.

## 2.5 Ensaio de sensibilidade com antimicrobianos (Disco-Difusão)

A atividade antimicrobiana foi verificada *in vitro* pelo método de disco-difusão em disco de papel, também conhecido por Teste de Sensibilidade (HEATLEY, 1944) a Antimicrobianos (TSA). O princípio da técnica consiste no preparo e inoculação de uma suspensão de bactérias de cultivo recente na superfície de uma placa de Agar Mueller Hinton.

Após a semeadura do inócuo bacteriano, dispersamos os discos de papel-filtro impregnados com os antimicrobianos em concentrações pré-estabelecidas, incubando-os em estufa por 24h, onde analisamos o padrão de crescimento ou inibição ao redor de cada disco (BALOURI et al., 2016). Mensuramos em milímetros os diâmetros dos halos de inibição de crescimento ao redor de cada disco, que estão relacionados à sensibilidade da amostra bacteriana e a velocidade de difusão do antimicrobiano no Agar, e realizamos a interpretação dos resultados utilizando critérios estabelecidos (VANDENBERGHE, VLIETINCK, 1991).

O experimento foi conduzido, utilizando-se as cepas de *Escherichia coli* AB1157, colônias provenientes de cultivo bacteriano recente de 18 às 24h, isoladas a partir de meios de cultura não seletivos, suspensas em ambiente estéril em 5mL de solução salina (Solução fisiológica estéril de NaCl 0,9%) até a obtenção de uma turvação compatível comparada com um tubo aferido na escala 0,5 de Mac Farland ( $1 \times 10^6$  UFC/ mL).

Em uma cabine de segurança biológica (Pachane – Modelo Pa 400 – ECO), a inoculação foi realizada com o auxílio de um swab estéril, embebido na solução bacteriana, e semeado de forma suave no formato de estrias na superfície do ágar em três direções, procurando abranger toda a superfície da placa (BALOURI et al., 2016).

Antes da aplicação dos discos, as placas semeadas foram deixadas em cima da bancada por aproximadamente cinco minutos, para permitir que o excesso de umidade da superfície do ágar fosse absorvido. Os discos foram aplicados na placa, com o auxílio de uma pinça estéril, pressionados suavemente para o contato total com a superfície do ágar.

As distâncias de 30 mm entre um disco e outro e de 15 mm da margem da placa foram mantidas, impedindo a superposição dos halos de inibição (SEJAS et al., 2003), conforme apresentado na Figura 5.

Figura 5- Técnica de disco-difusão em meio ágar, com discos dispostos de forma a não haver a sobreposição dos halos

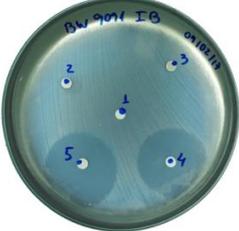
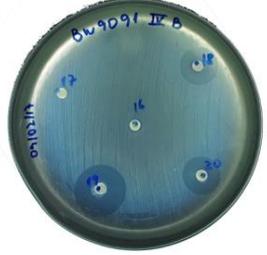
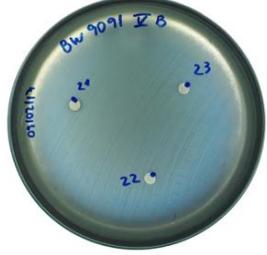


Fonte: O autor

Utilizou-se no plaqueamento, placas de petri de 150 mm, contendo 50 mL de meio ágar onde foram preparadas 15 placas, separadas em 4 grupos de 5 discos e um grupo de 3 discos, todos em triplicata, perfazendo um total de 23 discos. (PEIXOTO et al., 2014). Ao término desta etapa as placas foram armazenadas em estufa bacteriológica (Solab, SL-101) por 24h a 35°C. Na leitura dos resultados foi utilizada uma régua para medição de halos em antibiograma da marca Laborclin.

O protocolo do procedimento acima foi adotado para a cepa AB1157. Os resultados obtidos (Quadro 1, página 35) foram analisados qualitativamente e foram feitos a correlação dos diversos tratamentos utilizando diferentes volumes, associados ou não ao extrato aquoso de *Hibiscus sabdariffa* e os halos de inibição de crescimento bacteriano para a cepa *E. coli* AB AB1157

Quadro 1- Disposição do ensaio inibição do crescimento por disco-difusão

	<p><b>Posição 1-</b> 24µl de solução salina a 0,9%,  <b>Posição 2-</b> 24µl de extrato aquoso,  <b>Posição 3-</b> 12µl de extrato aquoso,  <b>Posição4-</b> 12µl de amoxicilina a 50 mg/ml e  <b>Posição 5-</b> 12µl de extrato aquoso combinado com 12µl de amoxicilina</p>
	<p><b>Posição 6-</b> Norfloxacin,  <b>Posição 7-</b> Norfloxacin combinado com extrato 12 µl,  <b>Posição 8-</b> 24µl de Amoxicilina a 50mg/ml,  <b>Posição 9-</b> cloramfenicol a 30 µg/ml (C 30 – OXOID LIMITED),  <b>Posição 10-</b> cloramfenicol a 30 µg/ml (C 30 – OXOID LIMITED) combinado com 12µL de extrato.</p>
	<p><b>Posição 11-</b> antibiótico ampicilina a 20 µg/ml (SAM 20 – OXOID LIMITED),  <b>Posição 12-</b> antibiótico ampicilina a 20 µg/ml (SAM 20 – OXOID LIMITED) combinado com 12µl de extrato aquoso,  <b>Posição 13-</b> 24µl de cloreto estanoso (SnCl<sub>2</sub>),  <b>Posição 14-</b> 12µl de cloreto estanoso,  <b>Posição 15-</b> 8µl de cloreto estanoso.</p>
	<p><b>Posição 16-</b> 12µl de cloreto estanoso mais 12µl de extrato aquoso,  <b>Posição17-</b> 8µl de extrato aquoso,  <b>Posição 18-</b> 12µl de extrato aquoso mais 12µl de peróxido de hidrogênio a 3% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>),  <b>Posição 19-</b> 12µl de peróxido de hidrogênio mais 12µl de SnCl<sub>2</sub>,  <b>Posição 20-</b> 8µl de peróxido de hidrogênio mais 8µl de SnCl<sub>2</sub> mais 8µl de extrato aquoso.</p>
	<p><b>Posição 21-</b> 24µl de peróxido de hidrogênio,  <b>Posição 22-</b> 12µl de peróxido de hidrogênio  <b>Posição 23-</b> 8µl de peróxido de hidrogênio.</p>

Fonte: Adaptado de SILVA, 2018b.

## 2.6 Cromatografia Líquida de Ultra eficiência (CLUE)

As análises de Cromatografia Líquida de Ultra eficiência Shimadzu, modelo CBM20A acoplada à Espectrometria de Ultravioleta e com Detector por Arranjo de Fotodiodos (Shimadzu SPD10A UV-VIS Detector); Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência da Shimadzu modelo LC30AD sistema de bomba quaternário (LC20ADXR); Forno CTO-20AC; Injetor SIL-30AC; Detector: SPD-M20A; Controladora: CBM-20A; Degaseificador DGU-20A, acoplado a um Espectrômetro de Massas Bruker Compact, UHPLC system, consistindo de um híbrido quadrupolo/íon trap com sistema binário de bombas (LC30AD) foram realizadas em triplicata na Plataforma de Métodos Analíticos (PMA) da Fundação Oswaldo Cruz.

Todos os solventes utilizados (metanol e ácido fórmico) foram grau de pureza para HPLC, da marca Tedia. O metanol foi filtrado em membrana PVDF 0,45 $\mu$ m e o a solução de ácido fórmico foi filtrado em membrana de nylon 0.45 $\mu$ m. Água desionizada (Thermo Scientific, Barnstead Nanopure®, System – Iowa/ EUA) foi utilizada para o preparo das soluções.

As análises de CLUE-UV-DAD foram realizadas em equipamento da Shimadzu, modelo CBM20A, com varredura entre 200-800 nm, a vazão de fluxo da bomba de 1 mL min<sup>-1</sup>, temperatura do forno 30°C, volume injetado de 20 mL e observando-se a 254, 288, 360, e 520 nm.

Os analitos foram separados em coluna Kinetex 2,6 $\mu$ m - PFP 100A 150 x 4,6mm (PHENOMENEX, Torrance, CA; Cód. SMA: CL 0272) e pré-coluna (2,5 cm x 3 mm) de mesma fase da coluna e eluída com a fase A (ácido fórmico 1% em água) e fase B (Metanol).

O gradiente de eluição consistiu em 15% da fase B de 0 a 0,01 minutos, em seguinte para apenas 1% da fase A; introduziu 15% da fase B por mais 5,20 min; fase B subiu 65% a partir de 18,60 minutos; o gradiente ficou nesta posição até 23,80 minutos; a porcentagem da fase B diminuiu para 15%; a partir de 28,70 minutos; o gradiente permaneceu nesta posição até 34,00 minutos. Totalizando um tempo de corrida de 34,01 minutos.

Para a determinação do perfil químico do extrato aquoso de *H. sabdariffa* foi utilizado um Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência da Shimadzu modelo LC30AD sistema de bomba quaternário (LC20ADXR); Forno CTO-20AC; Injetor SIL-30AC;

Detector: SPD-M20A; Controladora: CBM-20A; Degaseificador DGU-20A. Software utilizado UFLC Nexera Shimadzu: LbSolutions , versão 6.40. Em todos os casos, o volume de injeção foi de 2  $\mu\text{L}$ . A temperatura da coluna foi de 30  $^{\circ}\text{C}$ . O sistema LC foi acoplado a um Espectrômetro de Massas Bruker Compact, UHPLC system, consistindo de um híbrido quadrupolo/íon trap com sistema binário de bombas (LC30AD).

O software do UFLC Nexera Shimadzu: LabSolutions, versão 6.0 foi utilizado para aquisição e tratamento dos dados para o LC-MS. O espectrômetro de massas foi otimizado nos modos positivo e negativo de ESI Q-TOF/ EM.

O gás utilizado foi o nitrogênio; a velocidade do gás de entrada 10L/ min; a temperatura do gás de entrada: 220  $^{\circ}\text{C}$ ; pressão do gás nebulizador 5 bar, A agulha capilar foi mantida a 4500 Volts.

O instrumento foi controlado por um computador executando o de controle de acoplamento: Hystar, Versão 3.2. As condições cromatográficas utilizadas, tais como coluna cromatográfica, fase móvel, comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) e tempo de corrida para cada amostra, vazão da fase móvel e o volume da solução de amostra analisado foram as mesmas definidas para as análises de CLUE-UV/DADs. A escolha dessas variáveis para o Espectrometro de Massa instrumentação baseou-se no compromisso em alcançar uma cromatografia eficiente e separação bem resolvida assim como a melhoria do desempenho da ionização da amostra.

O preparo para injeção no CLUE foi similar exceto a quantidade de solvente utilizado na diluição e filtração da amostra. Alíquotas do extrato liofilizado [35,8 mg (CLUE-UV-DAD) e 5,8 mg (CLUE-EM)] foram adicionados de água ultra pura [1000  $\mu\text{L}$  (CLUE-UV-DAD) e 100 $\mu\text{L}$  (CLUE-EM)], agitada em vortex e levada ao ultrasom por 10 minutos. A solução obtida foi previamente filtrada em membrana PTFE de 0,22  $\mu\text{m}$  e injetada nos respectivos cromatógrafos líquidos.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Testes fitoquímicos preliminares

O extrato aquoso da folha de Hibiscus sabdariffa foram submetidos a uma série de reações químicas, no intuito de caracterizar a presença de terpenóides (positivo se houver mudança de cor para o vermelho), esteróides (positivo, se mudança de cor para o verde), flavonóides (surgimento de cor vermelha para flavonóides), taninos (positivo se mudança de coloração para azul ou preto-esverdeado), cumarinas (positivo se mudança do meio para amarelo), saponinas (positivo se apresentar espuma) e glicosídeos (positivo se houver aparecimento da cor verde azulada) , segundo metodologia descrita por Trease e Evans (1989). Os resultados obtidos estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Resultado dos testes fitoquímicos

<b>Constituinte</b>	<b>Resultado</b>
<b>Flavonóides</b>	Positivo
<b>Esteróides</b>	Negativo
<b>Taninos</b>	Negativo
<b>Cumarinas</b>	Positivo
<b>Saponinas</b>	Positivo
<b>Glicosídeos</b>	Negativo
<b>Terpenóides</b>	Negativo

Fonte: O autor

### 3.2- Ensaio de toxicidade

O potencial de toxicidade da espécie *Hibiscus sabdariffa*, foi determinado através do ensaio bioativo com *Artemia salina*. O bioensaio com *Artemia salina* é considerado muito útil para avaliação preliminar da toxicidade, já que é facilmente encontrado no mercado, está envolvido na pesquisa de isolamento, purificação e elucidação estrutural (CUNHA, 2011). Nos tubos de ensaios foram adicionados os extratos nas diluições que variam de 10 a 1000 µg/ mL, completados para 1 mL de água artificial do mar. Cada teste foi acompanhado de um controle negativo, o próprio solvente utilizado para a diluição das amostras. O extrato apresentou uma DL<sub>50</sub> de 1000 ppm (Figura 6).

Figura 6 - Curva de efeito tóxico e DL<sub>50</sub> para o extrato aquoso de *Hibiscus sabdariffa*

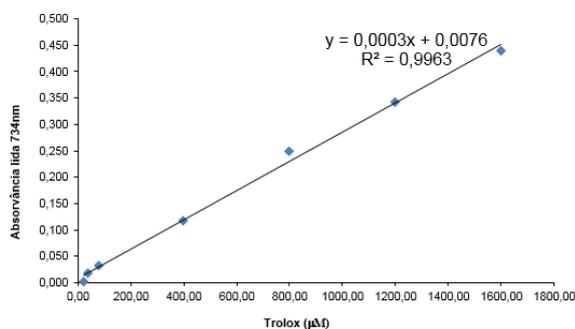


Fonte: O autor

### 3.3 Ensaio com redução do radical ABTS em TEAC

Os resultados da atividade antioxidante pelo método ABTS foram expressos como capacidade antioxidante total equivalente ao Trolox (valores TEAC). Constatou-se, a partir dos resultados que o extrato aquoso de *Hibiscus sabdariffa* apresenta capacidade antioxidante, com valor TEAC de  $324,95 \pm 17,75$  mM Trolox/g, determinada pela análise de regressão linear com coeficiente de correlação ( $R^2$ ) igual a 0,9963, equação da reta  $y = 0,0003x - 0,0076$  (figura 11), com um desvio padrão relativo de 0,35% entre as medidas.

Figura 7- Curva analítica do trolox para determinar a atividade antioxidante pelo método ABTS.

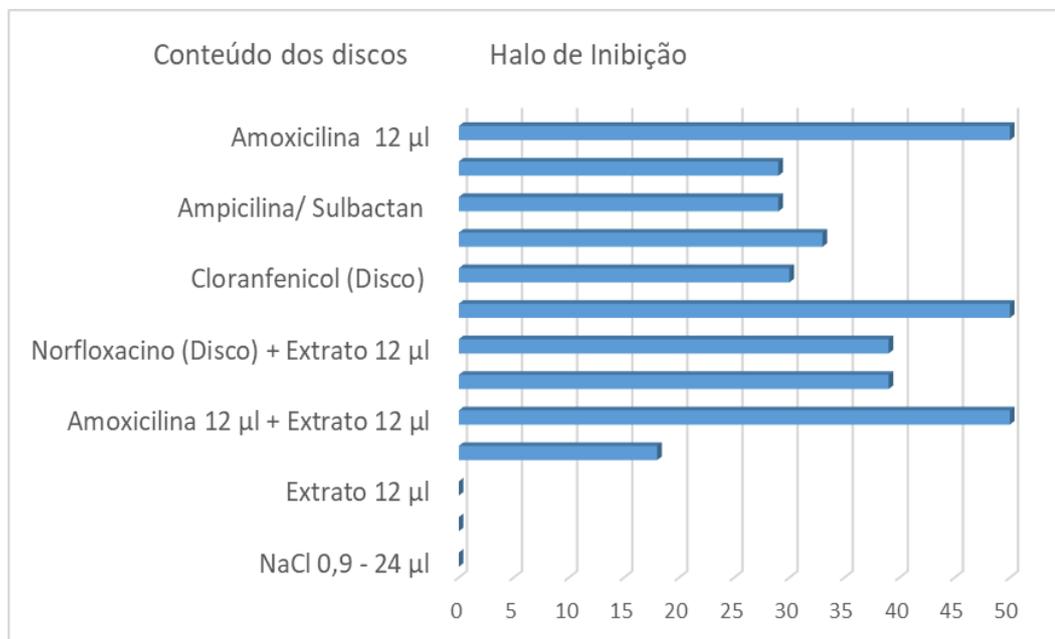


Fonte: O autor

### 3.4- Ensaio de sensibilidade aos antimicrobianos

Os resultados dos testes de disco-difusão para a cepa *Escherichia coli* – AB 1157 foram obtidos a partir dos cálculos da média dos diâmetros dos halos e para melhor verificação plotados em gráficos. Os resultados obtidos com a cepa *Escherichia coli* – AB1157 ainda não haviam sido descritos na literatura. A figura 8 representa os resultados do ensaio de disco-difusão dos halos dos extratos isolados, associados a antibióticos e o controle negativo com o cloreto de sódio. A figura 9 corresponde, respectivamente, a avaliação dos halos formados na exposição a agentes oxidantes e as respectivas associações ao extrato aquoso de *Hibiscus sabdariffa* sobre a cepa de *Escherichia coli* – AB 1157 e correlação dos diversos tratamentos utilizando diferentes volumes, associados ou não ao extrato aquoso *Hibiscus sabdariffa* e os halos de inibição de crescimento bacteriano para cepa AB 1157.

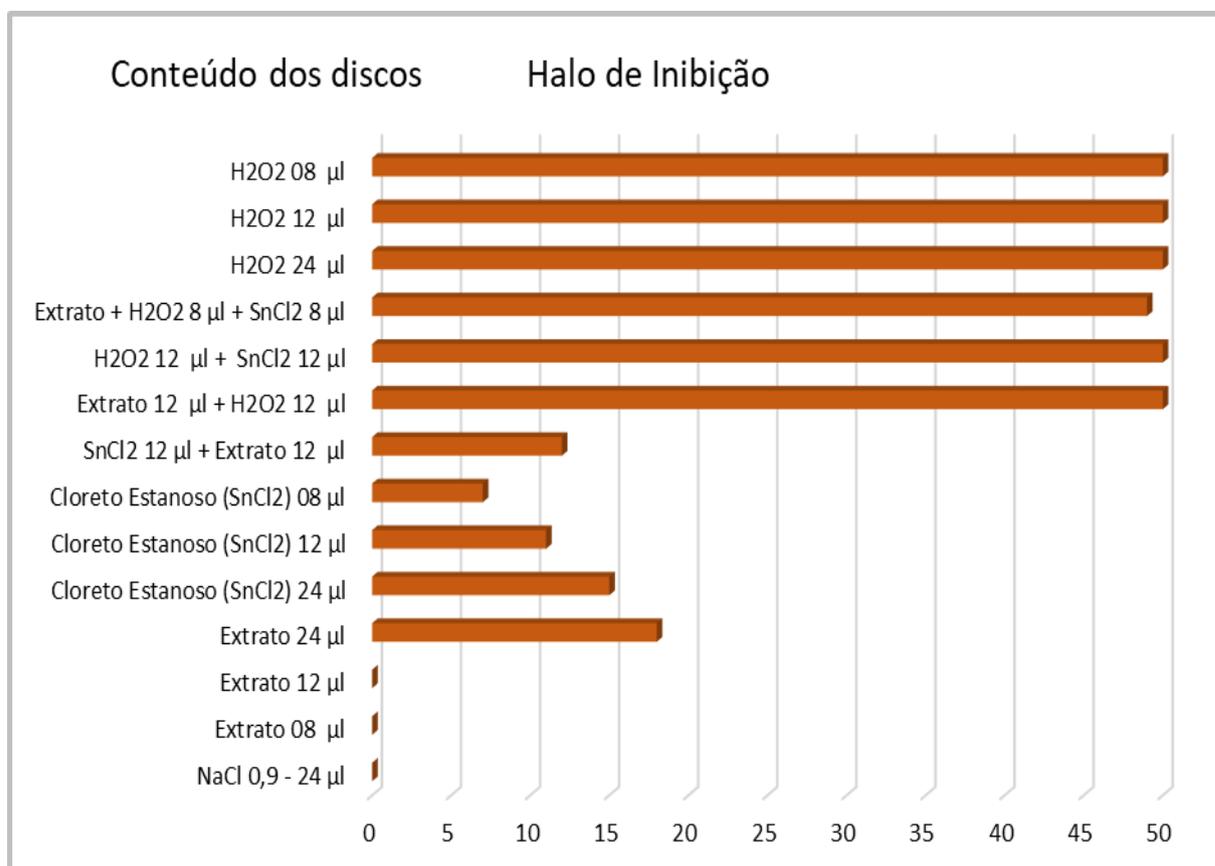
Figura 8 - Correlação dos diversos tratamentos\* utilizando diferentes volumes, associados ou não ao extrato aquoso de *Hibiscus sabdariffa* e os halos de inibição de crescimento bacteriano para a cepa *E. coli* AB AB1157.



Fonte: O autor

Legenda: Dados constantes no eixo das abscissas: 24 µL de Cloreto de Sódio (NaCl 0,9% P/V); 8 µL de Extrato Aquoso; 12 µL de Extrato Aquoso; 24 µL de Extrato Aquoso; 12 µL de Amoxicilina (50 mg / mL); 12 µL de Amoxicilina + 12 µL de Extrato Aquoso; Disco de Norfloxacino + 12 µL de extrato; 24 µL de Amoxicilina; Disco de Cloranfenicol (30 µg/mL); Disco de Cloranfenicol + 12 µL de Extrato Aquoso; Disco de Ampicilina associado a Sulbactan (20 µg/mL); Disco de Ampicilina associada a Sulbactan + 12 µL de Extrato Aquoso. No eixo das ordenadas encontramos os valores dos halos de inibição em milímetros.

Figura 9 - Correlação dos diversos tratamentos\* utilizando diferentes volumes, associados ou não ao extrato aquoso *in natura* de *Hibiscus sabdariffa* e os halos de inibição de crescimento bacteriano para cepa AB 1157



Fonte: O autor

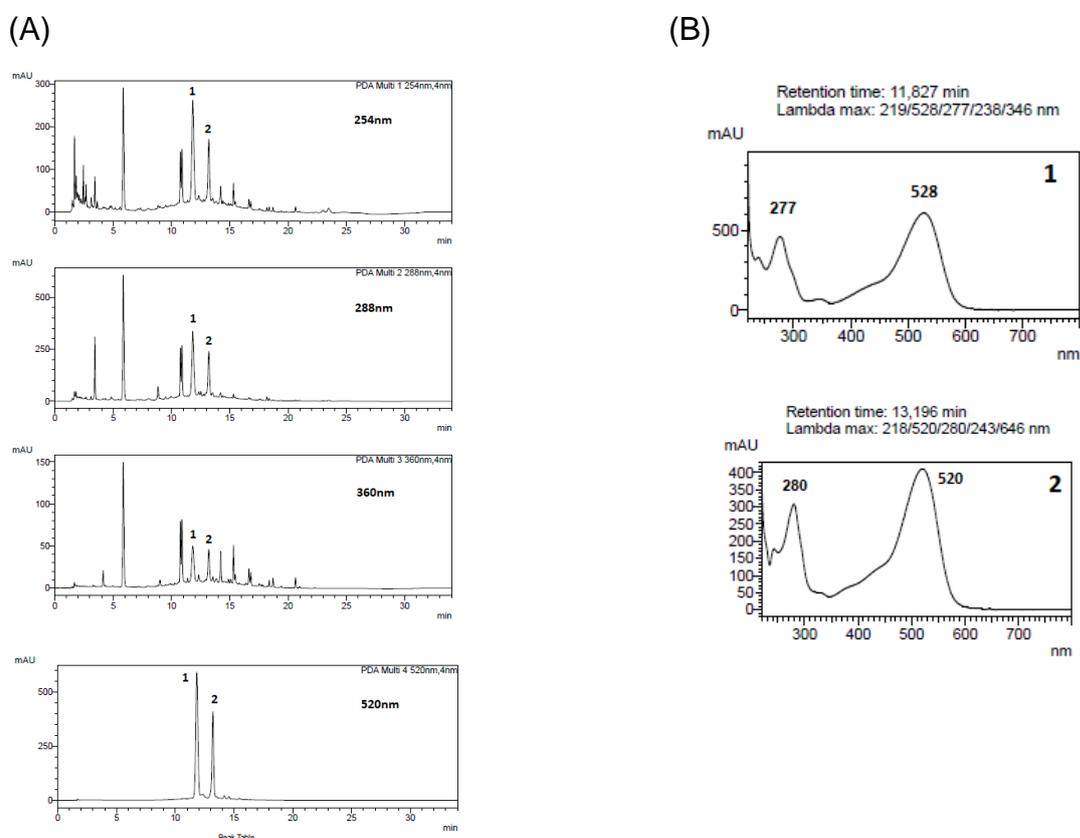
Legenda: Dados constantes no eixo das abscissas: 24 µL de Cloreto de Sódio (NaCl 0,9% P/V); 8 µL de Extrato Aquoso; 12 µL de Extrato Aquoso; 24 µL de Extrato Aquoso; 24 µL de Cloreto Estanoso (SnCl<sub>2</sub>) a 5 mg / mL; 12 µL de Cloreto Estanoso; 8 µL de Cloreto Estanoso; 12 µL de Cloreto Estanoso + 12 µL do Extrato Aquoso; 12 µL de Extrato Aquoso + 12 µL de Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% V/V); 12 µL de Peróxido de Hidrogênio + 12 µL de Cloreto Estanoso; 8 µL de Extrato Aquoso + 8 µL de Cloreto Estanoso + 8 µL de Peróxido de Hidrogênio; 24 µL de Peróxido de Hidrogênio; 12 µL de Peróxido de Hidrogênio; 8 µL de Peróxido de Hidrogênio. No eixo das ordenadas encontramos os valores dos halos de inibição em milímetros.

### 3.5 Cromatografia Líquida de Ultra eficiência (CLUE)

A figura 10 apresenta o perfil cromatográfico do extrato de *H. sabdariffa* obtido em Cromatógrafo Líquido de Ultra eficiência acoplado à Espectrofotometria por Ultravioleta e com Detector por Arranjo de Fotodiodos (CLUE-UV-DAD) em

diferentes comprimentos de onda. O cromatograma no comprimento de onda de 520 nm (Figura 10) revelou dois picos majoritários com tempo de retenção em 11,827 minutos ( $\lambda_{\text{máx}} = 219 \text{ nm}$  e  $528 \text{ nm}$ ) e 13,196 minutos ( $\lambda_{\text{máx}} = 218 \text{ nm}$  e  $520 \text{ nm}$ ). A figura 11 apresenta o cromatograma e o espectro de massas da substância 1 ( $t_r = 12,5$  minutos) e 2 ( $t_r = 13,7$  minutos) obtido em CLUE-ESI-TOF/ EM em modo positivo. O espectro de massas do extrato aquoso revelou um pico intenso (100%) que corresponde ao íon de  $m/z$  597,1444 (referente a substância 1) e no  $t_r = 13,7$  um pico intenso em  $m/z$  581,1492 (100%) e  $m/z$  769,1441 (0,1%). Este último corresponde um aduto resultante da combinação de dois fragmentos  $m/z$  371 combinados, um íon de sódio e átomos de  $\text{H}^+$ .

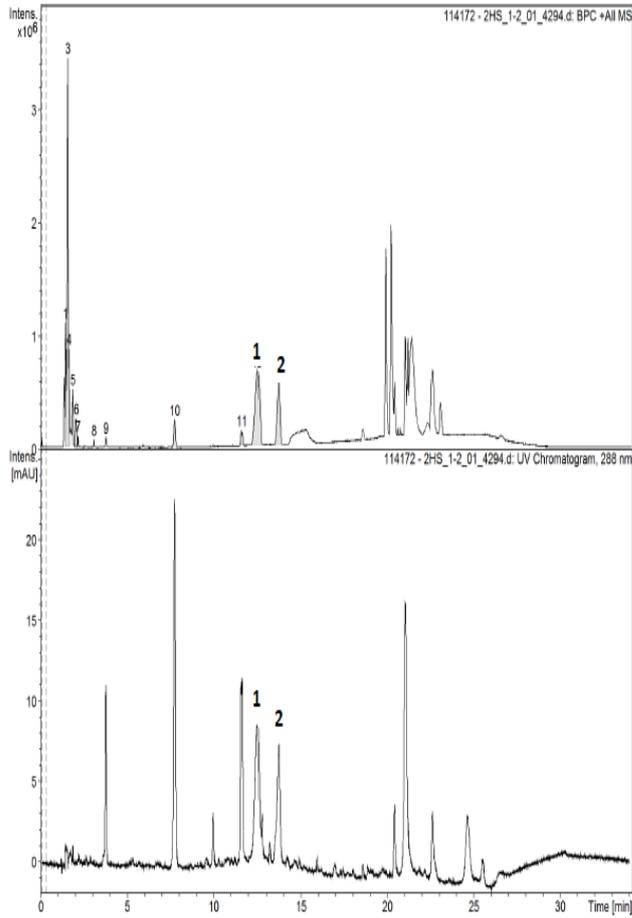
Figura 10 - Perfil cromatográfico (CLAE/UV) de extrato aquoso de folhas de *Hibiscus sabdariffa*. (B)- Espectro na região do ultravioleta do composto de tempo de retenção 11.827 minutos (1) e do composto com tempo de retenção 13,196 minutos, (2).



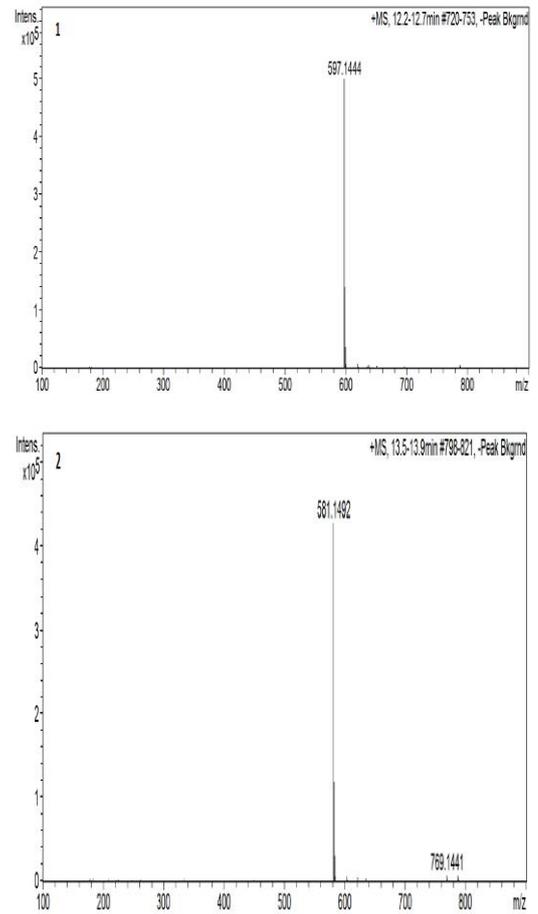
Fonte: O autor

Figura 11- (A)- Perfil cromatográfico (CLUE-UV-EM) de extrato aquoso de folhas de *Hibiscus sabdariffa*; (B) Espectrometria de massas modo positivo da substancias 1 e 2.

(A)



(B)



Fonte: O autor

## 4 DISCUSSÃO

O Papel das plantas no tratamento de doenças sempre foi de grande interesse e ajuda para a humanidade, fato este que pode ser comprovado pelas pesquisas milenares de grandes culturas, como exemplo, a Medicina Ayurveda (Indiana), a Medicina Unani, (Islâmica) e a Medicina Tradicional Chinesa. Com base em toda essa história, se fez necessário uma forma lógica e viável de estudar todos esses efeitos medicamentosos descobertos de forma empírica e de conhecimento passado horizontalmente de comunidade em comunidade. A farmacognosia é uma ciência que engloba disciplinas como a botânica, química, enzimologia, genética, farmacologia, dentre outras. De forma geral, é o estudo de produtos naturais, como uma fonte de novas drogas que leva ao desenvolvimento de fármacos eficazes. A busca racional e econômica de compostos pode melhorar a taxa de descoberta de fármacos usando métodos de alta tecnologia (EMBRAPA, 2006).

A literatura cita que os constituintes do hibisco são os ácidos orgânicos, os polissacarídeos e os flavonoides. Este último tem a maior relevância farmacológica, pois nas plantas apresentam diversas funções, podendo ser citadas a proteção contra a incidência de raios ultravioleta, proteção contra microrganismos patogênicos, ação antioxidante, ação alopática e inibição enzimática. Além disso, fornecem pigmentação as flores e outros efeitos benéficos. Muitos trabalhos relacionam as diversas atividades biológicas atribuídas ao hibisco para a saúde humana (antioxidante e antimicrobiana, por exemplo), à presença de compostos fenólicos geralmente encontrados em grande quantidade. As Antocianinas fazem partes da família dos flavonoides, são as responsáveis pela variável gama de cores que plantas que as contém apresentam, já que mudam com o pH. O cálice de hibisco apresenta com maior prevalência a delphinidina-3-sambubiosídeo (hibiscina), cianidina-3-sambubiosídeo (gossipicianina), cianidina-3,5-diglucosídeo, delphinidina (antocianidina) dentre outras. Em via de regra, a tabela 1 confirma certos pressupostos e características exaltadas ao *Hibiscus sabdarifa*, devido à presença de flavonóides que estão interligados a ação antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral (MACHADO, 2008), das cumarinas que podem apresentar atividade anticancerígenas, antimicrobiana e moluscicida (GASPAROTTO JUNIOR et al.,

2005) e as saponinas com vários estudos demonstrando sua atividade larvicida, inclusive sob larvas do *Aedes aegypti* – causador da dengue (GARCEZ et al., 2013).

Atualmente, o teste de letalidade utilizando-se *Artemia salina* é usado para identificar o efeito citotóxico de compostos químicos ou fitoquímicos. Este consiste em um teste preliminar na triagem de extratos aquosos ou metanólicos, toxinas, pesticidas e outros (SARAH, ANNY, MISBAHUDDIN, 2017). Verificou-se que o extrato aquoso de *Hibiscus sabdariffa* apresentou toxicidade frente a *Artemia salina*, uma vez que a DL<sub>50</sub> foi igual a 1000 ppm. Segundo Meyer e colaboradores (1982), são consideradas tóxicas substâncias que apresentam valores de DL<sub>50</sub> abaixo de 1000 ppm.

Uma das estratégias para se avaliar o potencial antioxidante do cálice de Hibisco foi utilizar o método ABTS<sup>+</sup>. Este método tem por finalidade avaliar a captura de radicais livres. Os padrões Trolox e ácido ascórbico são bastante utilizados para determinação de atividade antioxidante, visto que os mesmos possuem elevada atividade antioxidante. Portanto, maiores teores dos padrões nos extratos indicam maiores atividades antioxidantes (POLJSK & RASPOR, 2008). A vantagem do ABTS em vista de outros testes que existem para identificar a atividade antioxidante consiste na sua simplicidade, que pode entrar na rotina de qualquer laboratório bem como de inibir processos oxidativos orgânicos vistos em plantas. De acordo com BORGES (2011) os efeitos defensivos de antioxidantes naturais em frutas e vegetais estão relacionados a três grandes grupos: ácido ascórbico e fenólicos como antioxidantes hidrofílicos e carotenóides como antioxidantes lipofílicos. O valor TEAC caracteriza a capacidade da amostra testada em reagir com o radical ABTS<sup>+</sup>. O valor encontrado foi de 324,95 mM Trolox/g, que se faz justificado por ser um resultado bem similar ao encontrado por SAYARGO-AYERDI (2007). Este potencial pode ser considerado baixo devido ao modo como foi obtido. Ramos (2011) realizou uma análise antioxidante no extrato aquoso e no extrato etanólico do *Hibiscus sabdariffa*. Ele verificou que o extrato etanólico apresentou 263% de atividade antioxidante. Tal fator pode ser explicado devido ao poder extrator do solvente etanólico ter possibilitado a extração de uma maior quantidade de compostos bioativos. Além disso, a literatura cita que os valores da atividade antioxidante em extratos de *H. sabdariffa* variam de acordo com a origem geográfica da planta (ZHEN et al., 2016; WANG et al., 2013), processos de adubação (FORMAGIO et al., 2015; RAMOS et al., 2011) e métodos de extração (MACIEL et al., 2018; SOBOTA,

PINHO, OLIVEIRA, 2016). Logo, não podemos descartar a ação destes fatores abióticos na composição do extrato. Em contrapartida, o resultado se mostra bem positivo quando comparado a outras espécies da família Malvaceae com extração aquosa. Segundo os achados de OLIVEIRA (2012), ao pesquisar o potencial antioxidante da *Sidastrum micranthum*, *Wissadula periplocifolia*, e *Sidarhombifolia* apresentando TEAC 35.503 mM Trolox/g, 83.15 mM Trolox/g, 67.67 mM Trolox/g, respectivamente.

Muitos extratos de plantas medicinais possuem expressivas propriedades antimicrobianas, no entanto, a maioria delas permanece inexplorada. Neste estudo, foi observado, a partir das análises dos resultados obtidos que as amostras de um extrato aquoso do cálice de *Hibiscus sabdariffa* exercem efeito citotóxico dependente de concentração sobre as cepas bacterianas de *Escherichia coli* AB 1157, uma vez que foi observado halo de inibição a partir do volume de 24  $\mu$ L. Resultado em conformidade e até com maior halo que os encontrado por ALMEIDA e colaboradores (2018) que fez o mesmo teste, porém utilizando a cepa BW 9091, knockout para o gene *xthA*, responsável pelo sistema de reparo provindo de danos oxidativos no DNA bacteriano, mais precisamente, em fase exponencial de crescimento. Na análise da Amoxicilina isolada e conjugada ao extrato, os resultados não puderam ser devidamente avaliados. Ambos apresentaram formação de halo superior a 50 mm o que dificulta a interpretação dos dados. Na análise de Norfloxacino isolado e conjugado com o extrato, os halos formados se mostraram idênticos. Uma possível explicação para esse fato está no mecanismo de ação deste, pois ele atua como inibidor da enzima bacteriana DNA topoisomerase II (girase de DNA) e da DNA topoisomerase IV. Para muitas bactérias Gram-negativas, o principal alvo das quinolonas é a DNA-girase, ou seja, a conjugação do antibiótico com o extrato não altera sua atividade genotóxica. O extrato de *Hibiscus sabdariffa* se mostrou brandamente eficaz quando associado a antibióticos inibidores da síntese de proteínas, tal qual o cloranfenicol, um agente bacteriostático de amplo espectro, potente inibidor da síntese proteica bacteriana. O cloranfenicol se liga reversivelmente à subunidade 50s do ribossomo bacteriano e inibe a formação da ligação peptídica (DECK & WINSTON, 2012). Não há nenhuma pesquisa parecida que tente explicar o motivo desse sinergismo, por tanto, são necessários mais estudos para a elucidação do caso. Não houve alteração do halo formado por Ampicilina/ Sulbactam associados ou não ao extrato aquoso, o que é bem intrigante,

pois era esperado que houvesse a ação do extrato ou que esse tivesse um comportamento melhor do que as encontradas por Almeida e colaboradores (2018). Neste bioensaio, realizado com a cepa *E. coli* knockout (ALMEIDA et al., 2018), houve uma potencialização do efeito do antibiótico. A atividade antimicrobiana conferida pelos flavonóides pode ser devido à sua estrutura, pois eles têm a capacidade de formar um complexo combinado com as paredes celulares bacterianas. Além disso, com o número de grupos hidroxila presentes no anel fenólico, há um aumento da hidroxilação e com aumento hidroxilação, haverá aumento da atividade antimicrobiana. O local e o número de grupos hidroxila no grupo fenol parecem estar relacionados à sua toxicidade relativa a microrganismos, com evidências de que o aumento da hidroxilação resulta em aumento da toxicidade. Isso se faz lógico ao pensar que as plantas sintetizam os flavonóides em resposta à infecção microbiana, então não deve ser surpreendente encontrar a mesma ação *in vitro* (FULLERTON, 2011). O mecanismo de ação pode ocorrer pela inibição de vários processos celulares, seguidos por um aumento da permeabilidade plasmática que culmina em um efluxo de íons na célula bacteriana. Estes processos devem incluir a inibição do transporte de elétrons, a translocação de proteínas, inibir a cascata de fosforilação e prejudicar o funcionamento de certas enzimas (NAIR & SHANDA, 2006).

Avaliando o potencial citotóxico e genotóxico do extrato, foi usado como controles positivos o  $\text{SnCl}_2$  (cloreto estanoso), um sal de estanho que é um agente redutor capaz de se ligar ao DNA e produzir espécies reativas de oxigênio conforme reação de Fenton e o  $\text{H}_2\text{O}_2$  (peróxido de hidrogênio), substância quando isolada é inócua, mas capaz de formar radical  $\text{OH}^\cdot$  com metais de transição e frequentemente gera mutação no DNA, pois pode se difundir facilmente através das membranas celulares como a membrana do núcleo (BARREIROS et al., 2006). Não foi possível a quantificação dos resultados dos testes de extrato associados aos agentes redutores cloreto estanoso e peróxido de hidrogênio pois ambos mesmo isolados atingiram a concentração inibitória máxima, passando dos 50 mm de halo, sendo impossível uma comparação exata. A literatura afirma que o extrato aquoso de *H. sabdariffa* possui atividade antioxidante (SAYAGO-AYERDI, 2007). Esta ação antioxidante é devida a presença de compostos antocianinas que possuem propriedades antioxidantes e antiinflamatórias comprovadas e, sua ingestão na dieta alimentar auxiliam na prevenção de doenças cardiovasculares, neurológicas, câncer,

diabetes entre outras (CASTEÑEDA & OVANDO et al., 2009). Os resultados do presente estudo estão condizentes com esta afirmação pois o extrato foi capaz de proteger a cepa *E. coli* AB1157 contra danos oxidativos, em doses baixas, porém quando em doses elevadas o extrato passou a ter ação redutora semelhante ao cloreto estanoso. É provável que o extrato aquoso de *H. sabdariffa* apresente esta ação redutora, semelhantemente ao cloreto estanoso, através da oxidação de grupos tióis intracelulares resultando no aumento da produção de espécies reativas extracelular e, concomitantemente, na diminuição da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT, resultando em uma resposta redutora, o que pode vir a causar aumento nas espécies reativas de oxigênio, danos e morte celular. Vale ressaltar que para a comprovação destas hipóteses se fazem necessários novos testes com concentrações diminutas afim de que estes resultados sejam esclarecidos.

As duas substancias majoritárias presentes no extrato aquoso detectadas em modo positivo apresentaram massas  $m/z$  597,1444 ( $tr= 12,5$  min) e  $m/z$  581, 1492 ( $tr= 13,7$  min). Os  $\lambda_{m\acute{a}x}$  destas substancias foram observados próximos a 280 e 520 nm, confirmando presença flavonóides da classe das antocianinas no extrato (CASTEÑEDA-OVANDO et al., 2009). As antocianinas, são flavonóides hidroxilados e ligadas a açúcares, tais como: glicose, xilose, arabinose, ramnose e galactose ou dissacarídeos ligados a ácidos fenólicos, como *p*-coumárico, cafêico, fenílico e vanílico (CASTEÑEDA - OVANDO et al., 2009). A literatura cita que existe aproximadamente 22 agliconas conhecidas que compõem as antocianinas sendo que a pelargonidina, a cianidina, a peonidina, a delphinidina, a petunidina e a malvidina são as seis antocianinas mais comumente encontradas na natureza (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008). Elas possuem propriedades antioxidantes e antiinflamatórias comprovadas e, o seu consumo auxiliam na prevenção de doenças cardiovasculares, neurológicas, câncer, diabetes entre outras (CASTEÑEDA - OVANDO et al., 2009). Ao se comparar os valores dos respectivos íons moleculares observados no espectro de massas e os dados da literatura achamos similaridades com os respectivos massas de cianidina 3-sambubinosideo e delphinidina 3-sambubiosideo. Entretanto, ao se comparar os valores dos respectivos íons moleculares [ $m/z$  597,1444 ( $tr= 12,5$  min) e  $m/z$  581, 1492 ( $tr= 13,7$  min)] com os calculados com a massas moleculares de cianidina 3-sambubinosideo e delphinidina 3-sambubiosideo verificou-se que o diferença (erro descrito na tabela 2) foi

relativamente pequeno. Vale a pena ressaltar que RODRIGUES-MEDINA e colaboradores (2009), tiveram resultados similares aos erros encontrados. Contudo, RODRIGUES-MEDINA e colaboradores (2009) não conseguiram chegar uma conclusão fidedigna em relação a estas substâncias, apesar de utilizarem TOF-EM, IT-MS e dados das fragmentações de padrões autênticos. Entretanto, JIMÉNEZ-FERRER e colaboradores (2012) isolaram no extrato aquoso dos cálices de hibisco as antocianinas delphinidina-3-sambubiosídeo e cianidina-3-sambubiosídeo nas concentrações de 32,4 mg/g e 19,9 mg/g respectivamente com massas moleculares similares aos nossos. Logo, acreditamos que as substâncias 1 e 2 correspondem respectivamente a cianidina 3-sambubinosideo (1) e a delphinidina 3-sambubiosideo (2).

Tabela 2 - Dados de espectro de massa obtido em modo negativo ESI–TOF/ EM

Substancia	tr	Massa molecular	m/z experimental	m/z calculado	Erro (Da)	Substância Proposta
1	12,5	C <sub>26</sub> H <sub>29</sub> O <sub>16</sub>	597,1444	597.1450	0,0006	<u>Delphinidina 3-sambubiosideo</u>
2	13.7	C <sub>26</sub> H <sub>29</sub> O <sub>15</sub>	581, 1492	581.1501	0,0009	<u>Cianidina 3-sambubiosideo</u>

Fonte: O autor

## CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir a presença dos metabólitos secundários flavonoides, saponinas e cumarinas. O potencial antioxidante foi de 324,95 mM Trolox/g medido por ABTS. A dose letal mediana (DL<sub>50</sub>) do extrato foi de 1000 ppm. O extrato apresentou ação antimicrobiana na dose de 24µL e sinergismo quando associado a discos de cloranfenicol em cepas de *Escherichia Coli* selvagem (AB 1157) e atividade sinérgica com antibióticos inibidores da síntese de proteínas (Cloranfenicol) e em associação com Cloreto estanooso (SnCl<sub>2</sub>), sendo necessário novos testes para a identificação da ação conjunta com amoxicilina e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) já que ambas apresentam um halo maior que 50 milímetros. O extrato foi capaz de proteger a cepa *E. coli* AB1157 contra danos oxidativos, em doses baixas, porém quando em doses elevadas o extrato passou a ter ação redutora semelhante ao cloreto estanooso. É provável que o extrato aquoso de *H. sabdariffa* apresente esta ação redutora, semelhantemente ao cloreto estanooso através da oxidação de grupos tióis intracelulares resultando no aumento da produção de espécies reativas extracelular e, concomitantemente, na diminuição da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT resultando em uma resposta redutora, o que pode vir a causar aumento nas espécies reativas de oxigênio, danos e morte celular. Foram identificadas através de CLUE-ESI-TOF-EM as antocianinas: cianidina 3-sambubiosideo e a delphinidina 3-sambubiosideo como constituinte majoritário do extrato.

## REFERÊNCIAS

- ADESOKAN, I.A. ABIOLA, O.P., ADIGUN, M.O., ANIFOWOSE, O.A. Analysis of quality attributes of *Hibiscus sabdariffa* (zobo) drinks blended with aqueous extract of ginger and garlic. **African Journal of Food Science**, v. 7, n. 7, p. 174-177, 2013. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/AJFS/article-full-text-pdf/AF9B81712509>. Acesso em: 08 set. 2022.
- ALMEIDA, P.S.; NASCIMENTO, C.C.H.C.; NASCIMENTO, S. F.; GOMES M. LUISA; VASCONCELOS, S.D. D. DE; AZEVEDO, L.A.C.; STEPHENS, P. R. S.; DIRÉ, G. F.; BARRETO, A. S. Evaluation of the antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and genotoxic activities of the aqueous extract of calices of *Hibiscus sabdariffa* linn. **European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, p. 31-44, 2018.
- ALVES, CLAYTON Q., DAVID, J.M., DAVID, J.P., BAHIA, M.V., AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 2202-2210, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010001000033>. Acesso em: 11 set. 2022.
- ANOKWURU, C.P., ESIABA, I, AJIIBAVE, O., ADESUVI, A.O. Polyphenolic content and antioxidant activity of *Hibiscus sabdariffa* calyx. **Research Journal of Medicinal Plant**, v. 5, n. 5, p. 557-566, 2011.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos – versão 2, 2013. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/medicamentos/pesquisa-clinica/manuais-e-guias/guia-para-a-conducao-de-estudos-nao-clinicos-de-toxicologia-e-seguranca-farmacologica-necessarios-ao-desenvolvimento-de-medicamentos-versao-2.pdf/view>. Acesso em: 11 set. 2022.
- BAEZ, A., SHILOACH, J. Escherichia coli avoids high dissolved oxygen stress by activation of soxRS and manganese superoxide dismutase. **Microbial Cell Factories**. v.12, n.23, p. 2-9 12-23, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-23>. Acesso em: 11 set. 2022.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000100021>. Acesso em: 11 set. 2022.

BORGES, L.L. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 12, p. 1-20, 2011.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-33, 1998.

Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>. Acesso em: 11 set 2019.

CABISCOL, E., TAMARIT, J., ROS, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. **International Microbiology** v. 3, p. 3-8, 2000.

CABRAL, R.E.C., LEITÃO, A.C., LAGE, C., CALDEIRA-DE-ARAUJO, A., BERNARDO-FILHO, M., DANTAS, F.J.S., CABRAL-NETO, J.B. Mutational potentiality of stannous chloride: an important reducing agent in the Tc-99m-radiopharmaceuticals. **Mutation Research**, v. 408, n. 2, p. 129–135, 1998.

CARVALHO, C., MATTA, S., MELO, F., ANDRADE, D., CARVALHO, L., NASCIMENTO, P., ROSA, M. Cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus* Miers–Bignoniaceae): Estudo fitoquímico e toxicológico envolvendo *Artemia salina*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 1, p. 51-57, 2009.

Disponível em: <https://doi.org/10.5216/ref.v6i1.5861>. Acesso em: 11 set 2019.

CHASTEEN, T.G., FUENTES, D.E., TANTALEÁN, J.C., VÁSQUEZ, C.C. Tellurite: history, oxidative stress, and molecular mechanisms of resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, n. 4, p. 820-832, 2009.

CHOIA, H., YANG, Z., WEISSHAAR, J.C. Single-cell, real-time detection of oxidative stress induced in *Escherichia coli* by the antimicrobial peptide CM15. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 3, p. E303-E310, 2015.

Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1417703112>. Acesso em 11 set 2019.

CISSÉ, M., BOHUON, P., SAMBE, F., KANE, C., SAKHO, M., DORNIER, M. Aqueous extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*: Experimental kinetics and modeling. **Journal of Food Engineering**, v. 109, n. 1, p. 16-21, 2012.

CROXEN, M.A., LAW, R.J., SCHOLZ, R., KEENEY, K.M., WLODARSKA, M. Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 822-880, 2013.

Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>. Acesso em: 11 set 2019.

CUNHA, B.M. da. **Avaliação ecotoxicológica de distintos tipos de efluentes mediante ensaio de toxicidade aguda utilizando *Artemia salina* e *Lactuca sativa***. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) UFRGS, Porto Alegre. 2011.

Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/32773>. Acesso em: 11 set. 2022

DA-COSTA-ROCHA, I., BONNLAENDER, B., SIEVERS, H., PISCHEL, I., HEINRICH, M. *Hibiscus sabdariffa* L. – A phytochemical and pharmacological review. **Food Chemistry**, v.165, p. 424–443, 2014.

DA SILVA, E.C.A., PONTES, E.D.S., ALVES, M.E.F., SOUZA, M.L.A., NASCIMENTO, C. M.S. DE A., DANTAS, C.M.G., DA COSTA, T.A.M., SILVA, E.C. A. Utilização do Hibisco para Emagrecimento. **International Journal of Nutrology**, v. 11 01), p. S24-S327, 2018.

DANTAS, F.J.S.; MORAES, M.O.; CARVALHO, E.F.; VALSA, J.O.; BERNARDO-FILHO, M.; CALDEIRA-DE-ARAUJO, A. Lethality induced by stannous chloride on *Escherichia coli* AB1157: participation of reactive oxygen species. **Food and Chemical Toxicology**. v. 34, n.10, p. 959–962, 1996.

DE MATTOS, J.C.P., DANTAS, F.J.S., BEZERRA, R.J.A.C., BERNARDO-FILHO, M., CABRAL-NETO, J.B., LAGE, C.A.S., LEITÃO, A.C., CALDEIRA-DE-ARAUJO, A. Damage induced by stannous chloride in plasmid DNA. **Toxicology Letters**. v. 116, n. 1-2, p. 159–163, 2000.

DE MATTOS, J.C.P., LAGE, C., DANTAS, F.J.S.; MORAES, M. O.; NUNES, A.P.M.; BEZERRA, R.J.A. C.; FARIA, M.V.C.; LEITÃO, A.C.; CALDEIRA-DE-ARAUJO, A. Interaction of stannous chloride leads to alteration in DNA, triphosphate nucleotides and isolated bases. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 280, n. 1-2, p. 173–179, 2005.

DRISCOLL, A.J. Disk diffusion bioassays for the detection of antibiotic activity in body fluids: applications for the Pneumonia Etiology Research for Child Health project. **Clinical infectious diseases**, v. 54, n. suppl. 2, p. S159-S164, 2012.

DUTRA-DE-OLIVEIRA, J.E.; MARCHINI, J.C. **Ciências nutricionais: aprendendo a aprender**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2008, p. 784.

EATON, D.L., GILBERT, S.G. Princípios de Toxicologia. In: Klaassen CD. ed. *Toxicologia de Casarett e Doull: A Ciência Básica dos Venenos, Oitava Edição*. McGraw Hill; 2013.

Disponível em: <https://accesspharmacy.mhmedical.com/content.aspx>. Acesso em: 11 set. 2022.

FLOEGEL, A., KIM, D.O., CHUNG, S.J., KOO, S.I. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 1043–1048, 2011.

FORMAGIO, A.S.N., RAMOS, D.D., VIEIRA, M.C., RAMALHO, S.R., SILVA, M.M., ZÁRATE, N.A.H., FOGGIO, M.A., CARVALHO, J.E. Phenolic compounds of *Hibiscus sabdariffa* and influence of organic residues on its antioxidant and antitumoral properties. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 1, p. 69–76, 2015.

Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.07413>. Acesso em 11 set. 2019.

FULLERTON, M. Determination of antimicrobial activity of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) on *Escherichia coli* O157: H7 isolated from food, veterinary, and clinical samples. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 9, p. 950-956, 2011.

GARCEZ, W.S., GARCEZ, F. R.; SILVA, L. M. G. E.; SARMENTO, U. C. Substâncias de origem vegetal com atividade larvicida contra *Aedes aegypti*. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 363-393, 2013.

Disponível em: <http://www.uff.br/rvq>. Acesso em: 11 set. 2022.

GASPAROTTO JUNIOR, A., BRENZAN, M.A., PILOTO, I.C., DIÓGENES, AG.C., NAKAMURA, C.V., FILHO, B.P.D., FILHO, E.R., FERREIRA, A.G. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade moluscicida do *Calophyllum brasiliense* Camb (clusiaceae). **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 575, 2005.

GIADA, M. L. R.; MANCINI FILHO, J. Importância dos compostos fenólicos da dieta na promoção da saúde humana. **Ciências Biológicas e da Saúde**, Ponta Grossa, v. 12, n. 4, p. 7-15, 2006.

GUINDANI, M. **Estudo do processo de extração dos compostos fenólicos e antocianinas totais do *Hibiscus sabdariffa***. In: XX congresso de engenharia química. Florianópolis–Santa Catarina. 2014. p. 2-7.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radical and other reactive species in disease. In: HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *In: HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., Eds. Free radicals in biology and medicine*. 3. ed. Oxford: Clarenton Press, 1999. p. 617-783.

HAMIDI, M.; JOVANOVA, B., PANOVSKA, T. Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. **Macedonian Pharmaceutical Bulletin**, v. 60, n. 1, p. 9-18, 2014.

HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n.8, 2928-35, 2005.

HAVERROTH, M. Etnobotânica, saúde e povos indígenas. In: HAVERROTH, M. (Org.). **Etnobiologia e Saúde de Povos Indígenas**. Recife, PE: NUPEEA 2013. p. 37-64.

HEATLEY, N.G. A method for the assay of penicillin. **The Biochemical journal**, v. 38, n. 1, p. 61–65, 1944.

HERMES-LIMA, M. Oxidative stress and medical sciences. In: STOREY, K.B. (Ed.). **Functional metabolism: regulation and adaptation**. USA: Wiley, 2004. p. 369-382.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D.A.; CROUCH, S. R., PASQUINI, C. **Princípios de análise instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009, p. 830.

IGLESIAS, A.H. **Introdução ao Acoplamento Cromatografia Líquida–Espectrometria de Massas**. Waters Technologies, Barueri, SP, Brasil, 2016.

IMLAY, J.A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. **Nature Reviews Microbiology**, v.11, p. 443–454, 2013.

ISMAIL, A., IKRAM, E. H. K., & NAZRI, H. S. M., Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seeds nutritional composition protein quality and health benefits. **Food**, v. 2, n. 1, p. 1–16, 2008.

JIMÉNEZ-FERRER, E.; ALARCÓN-ALONSO, J.; AGUILAR-ROJAS, A.; ZAMILPA, A.; JIMÉNEZ-FERRER C., I; TORTORIELLO, J.; HERRERA-RUIZ, M. Diuretic effect of compounds from *Hibiscus sabdariffa* by modulation of the aldosterone activity. **Planta medica**, v. 78, n. 18, p. 1893-1898, 2012.

- KRONVALL, G., GISKE, C. G., KAHLMETER, G. Setting interpretive breakpoints for antimicrobial susceptibility testing using disk diffusion. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 4, p. 281-290, 2011.
- KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R.; Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 726-732; 2005.
- LAGUERRE, M.; LECOMTE, J., VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Review. Progress in Lipid Research**, 46, p. 244-282, 2007.
- LEITE, NADGHIA F. SOBRAL-SOUZA, C. E., ALBUQUERQUE, R. S., BRITO, D. I., LAVOR, A. K., ALENCAR, L. B. CUNHA, F. A. Actividad antiparasitaria in vitro citotóxica de cariofileno y eugenol contra *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania brasiliensis*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 18, n. 4, p. 522-528, 2013.
- LEPENGUE, N. A., MOUARAGADJA, I., BATCHI, B.M., AKE, S. Etude de quelques caractéristiques physico chimiques du filtrat toxique de *Phoma sabdariffae* Sacc., agent pathogène de la roselle. **Sciences & Nature**, v.6, n. 2, p. 95-105, 2009.
- LIN, X., XU, X., YANG, C., ZHAO, Y., FENG, Z., DONG, Y. Activities of antioxidant enzymes in three bacteria exposed to bensulfuron-methyl. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. p.1899-1904, 2009.
- LORENZI, H., MATOS, F.J., FRANCISCO, J.M. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.
- MACHADO, H., NAGEM, T. J., PETERS, V. M., FONSECA, C. S., & OLIVEIRA, T. T. D. (2008). Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.
- MACIEL, M.J., PAIM, M.P., CARVALHO, H.H.C., WIEST, J.M. Avaliação do extrato alcoólico de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) como fator de proteção antibacteriana e antioxidante. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 462-470, 2012.
- MACIEL, L.G., DO CARMO, M.A.V., AZEVEDO, L., DAGUER, H., MOLOGNONI, L., DE ALMEIDA, M.M.; GRANATO, D., ROSSO, N.D. *Hibiscus sabdariffa* anthocyaninsrich extract: chemical stability, in vitro antioxidant and antiproliferative activities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 113, p. 187–197, 2018.
- MAISUTHISAKUL, P., SUTTAJIT, M., PONGSAWATMANIT, R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. **Food Chemistry**, 100, p. 1409-1418, 2007.
- MAJOWICZ, S.E., JONES-BITTON, A., SARGEANT, J.M., STAPLETON, J., ANGULO, F.J. Global incidence of human Shiga toxin–producing *Escherichia coli* infections and deaths: a systematic review and knowledge synthesis. **Foodborne pathogens and disease**, v. 11, n. 6, p. 447-455, 2014.
- MALDANER, L., JARDIM. I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, 214-222, 2009.  
Disponível em: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140261>. Acesso em: 11set 2019.

- MARQUES, C., DUTHOIT, M., ALVARENGA, B., ROSEIRO, L.B. **Implementação e validação do método de Folin-Ciocalteu para a determinação do teor em compostos fenólicos totais – aplicação a extratos de flor de cardo e queijo.** Tese de Licenciatura, Instituto Politécnico de Beja. Beja, 2004.
- MCCORMICK, M.L., BUETTNER, G.R., BRITIGAN, B.E. Endogenous Superoxide Dismutase Levels Regulate Iron-Dependent Hydroxyl Radical Formation in *Escherichia coli* Exposed to Hydrogen Peroxide. **Journal of bacteriology**, v. 180, n. 3, p. 622–625, 1998.
- MEYER, B.N., FERRIGNI, N.R., PUTNAM, J.E., JACOBSEN, L.B., NICHOLS, D.E., MCLAUGHLIN J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 3, p. 31-34, 1982.
- MOHAMED, B.B; SULAIMAN, A.A.; DAHAB, A.A. Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in Sudan, cultivation and their uses Bulletin of Environment, **Pharmacology and Life Sciences**, Life Sci, v. 1, n. 6, p. 48-54, 2012.
- MORTON, J.F. **Fruits of warm climates.** Echo Point Books & Media; Edição ilustrada 1987.
- NAIR, R., SHANDA S. Activity of some medicinal plants against certain pathogenic bacterial strains. Indian **Journal of Pharmacology**, v. 38, n. 2, p. 142, 2006. Disponível em: <https://www.ijp-online.com/text.asp?2006/38/2/142/24625>. Acesso em: 11 set 2019.
- NASCIMENTO, P.F., NASCIMENTO, A.C.; RODRIGUES, C.S., ANTONIOLLI, A.R., SANTOS, P.O., BARBOSA-JÚNIOR, A.M., TRINDADE, R.C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100020>. Acesso em: 11 set 2019.
- OGUZIE, E.E. Corrosion inhibitive effect and adsorption behaviour of *Hibiscus sabdariffa* extract on mild steel in acidic media. **Portugaliae Electrochimica Acta**, v. 26, n. 3, p. 303-314, 2008.
- OHSE, S.; CARVALHO, S.M.; REZENDE, B.L.A.; OLIVEIRA, J.B.; MANFRON, P.A.; DOURADO NETO, D. Produção e composição química de hortaliças folhosas em hidroponia. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 2, p. 155-163, 2012.
- OKEREKECN, I.F., CHUKWUMA, M. O. Phytochemical analysis and medicinal uses of *Hibiscus sabdariffa*. **International Journal of Herbal Medicine**, v. 2, n. 6, p. 16-19, 2015.
- OLALEYE, M.T. Cytotoxicity and antibacterial activity of methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 1, n. 1, p. 009-013, 2007.
- OLIVEIRA, A.M.F., SOUSA PINHEIRO, L., SOUTO PEREIRA, C.K., NEVES MATIAS, W., ALBUQUERQUE GOMES, R., SOUZA CHAVES, O. Total phenolic content and antioxidant activity of some Malvaceae family species. **Antioxidants (Basel)**, v. 1, n. 1, p. 33-43, 2012.

OLOWA, L.F., NUÑEZA, O.M. Brine shrimp lethality assay of the ethanolic extracts of three selected species of medicinal plants from Iligan City, Philippines. **International Research Journal of Biological Sciences**, v. 2, n. 11, p. 74-77, 2013.

ORWA, C; MUTUA, A.; KINDT, R.; JAMNADASS, R.; ANTHONY, S. 2009, **Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0.**

Disponível em:

[http://www.worldagroforestry.org/treedb2/AFTPDFS/Hibiscus\\_sabdariffa.pdf](http://www.worldagroforestry.org/treedb2/AFTPDFS/Hibiscus_sabdariffa.pdf). Acesso em: 13 nov. 2019.

PEIXOTO, J.V., ROCHA, M.G., NASCIMENTO, R.T.L., MOREIRA, V.V., KASHIWABARA, T.G.B. Candidíase: uma revisão de literatura. **Brasilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 8, p. 75–82, 2014.

PEREIRA, R.J., CARDOSO, M das G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p 146-152, 2012.

PUNGARTNIK, C., VIAU, C., PICADA, J., CALDEIRA-DE-ARAUJO, A., HENRIQUES, J.A.P., BRENDEL, M. Genotoxicity of stannous chloride in yeast and bacteria. **Mutation Research**, v. 583, n. 2, p. 146–157, 2005.

RAMALHO, V.C. **Ação antioxidante de  $\alpha$ -tocoferol e extrato de alecrim em óleo de soja submetido à termoxidação** (Dissertação de Mestrado). São José do Rio Preto, São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 2005.

RAMOS, D.D., VIEIRA, M.C., FORMAGIO, A. S.N., CARDOSO, C.A.L., RAMOS, D. D., CARNEVALI, T.O. Atividade antioxidante de *Hibiscus sabdariffa* L. em função do espaçamento entre plantas e da adubação orgânica. **Ciência Rural**, v. 41, n. 8, p. 1331–1336, 2011.

Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782011005000107>. Acesso em : 11 set 2019.

RE. R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3). Aceso em: 11 set 2019.

REID, A.B., KURTEN R.C., MCCULOUGH, S.S., BROCK, R.W., HINSON, J.A. Mechanism of acetaminophen-induced hepatotoxicity: role of oxidative stress and mitochondrial permeability transition in freshly isolated mouse hepatocytes. **Journal of Pharmacology and Experimental**, v. 312, n. 2, p. 509-16, 2005.

Disponível: <https://doi.org/10.1124/jpet.104.075945>. Acesso 11 set 2019.

ROCHA, F.D. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 631-639, 2007.

Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000400024>. Acesso em: 11 set. 2019.

ROGERS, D. Christopher. Anostraca Catalogus (Crustacea: Branchiopoda). **Raffles Bulletin of Zoology**, v. 61, n. 2, 2013.

Disponível em:

[https://www.researchgate.net/publication/286163567\\_Anostraca\\_catalogus\\_Crustacea\\_a\\_Branchiopoda](https://www.researchgate.net/publication/286163567_Anostraca_catalogus_Crustacea_Branchiopoda). Acesso em: 11 set 2019.

ROSA, S.E. **Caraterísticas nutricionais e fotoquímicas em diferentes preparações e apresentações de Hibiscus Sabdariffa L. (hibisco, vinagreira, rosela, quiabo-de-angola, caruru-daguiné) Malvaceae**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e tecnologia de alimentos, (Trabalho de conculaos de curso – TCC em nutrição). Novembro,2013.

ROSANO, G. L., CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 172, 2014.

SALEM, M. Z., OLIVARES-PÉREZ, J., SALEM, A. Z. M. Studies on biological activities and phytochemicals composition of Hibiscus species-A review. **Life Science Journal**, v. 11, n. 5, p. 1-8, 2014.

SARAH, Q S.; ANNY, F. C.; MISBAHUDDIN, M. Brine shrimp lethality assay. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 12, n. 2, p. 5-2017, 2017.

SEJAS, L.M., SILBERT, S., REIS, A.O., SADER, H.S. Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 1, p. 27-35, 2003.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. Technomic Publishing Co. Inc, Lancaster, PA, USA, and Basel, 1995.

SILVA, E.J., NASCIMENTO C.C.H.C., NASCIMENTO, S.F., VASCONCELOS, S.D. D. DE, NOGUEIRA, R.I., STEPHENS, P.R.S., BARRETO, A.S., DIRÉ, G.F. study of the biological effects of aqueous extracts of *Schinus terebinthifolius* raddi, on the survival fraction of mutant and wild strains of *Escherichia coli*. **Merit Rearch Jornals**. v 6 p 89, 2018a.

SILVA, E. de J. da, **Estudo dos Efeitos Biológicos de Extratos Aquosos de *Schinus terebinthifolius* Raddi, sobre a fração de sobrevivência de cepas mutantes e selvagens de *Escherichia coli***. (Dissertação Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental), Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, UEZO, Rio de Janeiro, RJ, 2018b

SILVA, L.A. DA; RAPOSO, J.D.A.; CAMPOS, L. P. G.; CONCEIÇÃO, E. C. DA; OLIVEIRA, R. B. DE; MOURÃO, R. H. V. Atividade antioxidante do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* diferentes métodos de análises antioxidantes (ABTS, DPPH, FRAP,  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico). **Revista Fitos**, v. 12, n. 2, p. 117-126, 2018.

SOBOTA, J.D.F., PINHO, M.G., OLIVEIRA, V.B. Perfil físico-químico e atividade antioxidante do cálice da espécie *Hibiscus sabdariffa* L. a partir do extrato aquoso e alcoólico obtidos por infusão e decocto. **Revista Fitos**, v. 10, n. 1, p. 33–46, 2016.

SOUSA, C.M.D.M.; SOUSA, C.M.M., SILVA, H.R. VIEIRA-JUNIOR, G.M., AYRES, M.C.C., COSTA, C.L.S., ARAÚJO, D.S., CAVALCANTE, L.C.D., BARROS, E.D.S., ARAÚJO, P.B.M., BRANDÃO, M.S., CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade

antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200021>. Acesso em: 11 set 2019.

SOUSA, M.S.B.; VIEIRA, L.M.; LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de resíduos de polpas de frutas tropicais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 3, p. 202-210, 2010.

Disponível em: <https://doi.org/10.4260/BJFT2011140300024>. Acesso em: 11 set. 2019.

SUCUPIRA, N. R. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Journal of Health Sciences**, v. 14, n. 4, p. 263-269, 2015.

Disponível em: <https://doi.org/10.17921/2447-8938.2012v14n4p%25p>. Acesso em 11 set 2019.

TAKEMOTO, E., TEIXEIRA FILHO, J., GODOY, H.T. Validação de metodologia para a determinação simultânea dos antioxidantes sintéticos em óleos vegetais, margarinas e gorduras hidrogenadas por CLAE/UV. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1189-1194, 2009.

Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000500020>. Acesso em: 11 set 2019

TSAI, T.H., TSAI, P.J., SU, S.C, Antioxidant and anti-inflammatory activities of several commonly used spices. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 1, p. 93-7, 2005.

Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb09028.x>. Acesso em: 11 set 2019.

TREASE, G.E., EVANS, W.C. Pharmacognsy. 11 th edn. Brailliar Tiridel Can. Macmillian publishers. 1989.

UMBUZEIRO, G.A., KUMMROW, F., REI, F.F.C. Toxicologia, padrões de qualidade de água e a legislação. **InterfaceHS - Revista de Gestão Integrada em Saúde do Trabalho e Meio Ambiente**, v. 5, n. 1, p. 1-15, 2010.

Disponível em:

[http://www.interfacehs.sp.senac.br/br/sumario\\_secao\\_interfacehs.asp?ed=13](http://www.interfacehs.sp.senac.br/br/sumario_secao_interfacehs.asp?ed=13).

Acesso 11 set 2019.

VALENTI, L., RISO, P., MAZZOCCHI, A., PORRINI, M., FARGION, S., AGOSTONI, C. Dietary anthocyanins as nutritional therapy for nonalcoholic fatty liver disease. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2013, p. 1-8, 2013.

Disponível em: <https://doi.org/10.1155%2F2013%2F145421>. Acesso em: 11 set 2019.

VANDENBERGHE, D.A., VLIETINCK, A.J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: DEY, P.M., HARBORNE, J.B., HOSTETTMAN, K., (eds), **Methods in Plant Biochemistry, Assay for Bioactivity**, Vol. 6. Academic Press, 1991.

WANG, D., MENG, J., GAO, H., XU, K., XIAO, R., ZHONG, Y., LUO, X., YAO, P., YAN, H., LIU, L. Evaluation of reproductive and developmental toxicities of Pu-erh

black tea (*Camellia sinensis* var. *assamica*) extract in Sprague Dawley rats. **Journal Ethnopharmacology**, v. 148, n. 1, p. 190-198, 2013.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.04.009>. Acesso em: 11 set 2019.

ZHEN, J.; VILLANO, T. S., GUO, Y., QI, Y., CHIN, K., PAN, M., HO, C., SIMON, J. E., WU, Q. Phytochemistry, antioxidant capacity, total phenolic content and anti-inflammatory activity of *Hibiscus sabdariffa* leaves. **Food Chemistry**, v. 190, p. 673-680, 2016.

Disponível em: <https://doi.org/10.3390%2Ffoods10010131>. Acesso em 11 set 2019.

## ANEXO A - Formato final do 1º artigo científico submetido



Available online at [www.jpspublications.com](http://www.jpspublications.com)

Life Science Archives (LSA)

ISSN: 2454-1354

Volume - 5; Issue - 1; Year - 2019; Page: 1551 - 1576

DOI: 10.22192/lsa.2018.5.1.5



### Research Article

## CHEMICAL AND BIOLOGICAL STUDY OF AQUEOUS EXTRACT OF *Hibiscus sabdariffa* Linn. (MALVACEAE)

D. V. Dos Santos<sup>1</sup>, T. B. M. Silva<sup>1</sup>, M. Dourados<sup>2</sup>, T. B. Bandini<sup>2</sup>, M. Soares<sup>2</sup>, D. R. S. F. Paím<sup>3</sup>, C. C. H. C. Nascimento<sup>4</sup>, S. D. D. De Vasconcelos<sup>4,5</sup>, P. R. S. Stephens<sup>6</sup>, P. Saranraj<sup>7</sup>, G. F. Dire<sup>4,2</sup> and A. S. Barreto<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Chemical and Biological Analysis (LAQB), Foundation State University Center of the West Zone (UEZO), Avenue Manuel Caldeira de Alvarenga, Campo Grande, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>2</sup>Estácio de Sá University (UNESA), Rio De Janeiro, Brazil.

<sup>3</sup>Laboratory of Analytical Methods and Mass Spectrometry (LACEM), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Siranando Nabuco Avenue, 100, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>4</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Centro de Tecnologia, Escola de Química.

<sup>5</sup>Federal Center of Technological Education Celso Suckew da Fonseca- CEPET-NT, Rio de Janeiro, RJ- Brazil.

<sup>6</sup>Laboratory of Innovations in Therapies, Teaching and Bioproducts/ LITEB, Oswaldo Cruz Institute, IOC/ FIOCRUZ.

<sup>7</sup>Department of Microbiology, Sacred Heart College (Autonomous), Tirupattur, Tamil Nadu, India.

### Abstract

*Hibiscus sabdariffa*, popularly known as Hibiscus, Vinegar or Guinea okra, is a plant that has gained a great deal of interest in academic research. Most likely due to its antioxidant property. The preliminary phytochemical profile of the aqueous extract of the chalice of *Hibiscus sabdariffa* presented flavonoids, anthocyanins, coumarins and saponins. The antioxidant potential was 324.95 mM Trolox/g as measured by ABTS. The median lethal dose (LD<sub>50</sub>) of the extract was 1000 ppm. The extract showed 24 µL antimicrobial action and synergism when associated with Chloramphenicol discs in strains of wild *Escherichia coli* (AB 1157). According to the results of the Spectrophotometric and Conductimetric tests, the extract presented good stability against UV radiation, exposure to oxygen and temperature increase. Anthocyanins: 3-sambubioside cyanidin and 3-sambubioside delphinidin were identified as the major constituent of the extract through UHPLC-ESI-TOF-MS.

### Article History

Received: 20.01.2019

Revised: 10.02.2019

Accepted: 27.02.2019

**Key words:** *Hibiscus sabdariffa*, Aqueous Extract, Lethal Dose, Spectrophotometry, Conductimetry and Chromatography.

### 1. Introduction

The discovery of the components present in medicinal plants as well as their mechanisms of biological action has been one of the major challenges for chemistry,

biochemistry and pharmacology (Hamidi, 2014). However, despite the increase of studies in this area, what is observed is that only about 20 % of the existing plant species were studied for their medicinal potential (ANVISA, 2012; Hamidi et al., 2014; Salem et al., 2014; Silva et al., 2018). Among the pharmacological properties studied in natural products are the antioxidant and

\*Corresponding author: Dr. A. S. Barreto  
E-mail: [alaidesa@uezo.rj.gov.br](mailto:alaidesa@uezo.rj.gov.br)



**ANEXO B - Comprovação do 1º capítulo de livro submetido**

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DO EXTRATO AQUOSO  
*HIBISCUS SABDARIFFA* (MALVACEAE)**

**CHEMICAL AND BIOLOGICAL STUDY OF WATER EXTRACT  
*HIBISCUS SABDARIFFA* (MALVACEAE)**

**Davi Vicente dos Santos (autor)**

Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Fundão - Rio de Janeiro  
<http://lattes.cnpq.br/4850826170168040>

**Marcia Maria Dourado Maranhão**

Centro Universitário Estadual da Zona Oeste  
Campo Grande – Rio de Janeiro  
<http://lattes.cnpq.br/7037740958582472>

**Naomi Kato Simas**

Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Fundão – Rio de Janeiro  
<http://lattes.cnpq.br/7460060045516567>

**Taiane Borges Machado Silva**

Centro Universitário Estadual da Zona Oeste  
Campo Grande – Rio de Janeiro  
<http://lattes.cnpq.br/9482174552139891>

**Gláucio Diré Feliciano**

Centro Universitário Estadual da Zona Oeste  
Campo Grande – Rio de Janeiro  
<http://lattes.cnpq.br/7179565411550967>

**Alaide de Sá Barreto**

Centro Universitário Estadual da Zona Oeste  
Campo Grande – Rio de Janeiro  
<http://lattes.cnpq.br/4788272992943811>

**Data de submissão:** 08/01/2020

---